



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS
EXTRACTOS ETANÓLICO Y SUBEXTRACTOS CLOROFÓRMICO Y
ETÉREO DE *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

PRESENTADO POR

JÉSSICA ADRIANA TAPIA CONTERO

RIOBAMBA – ECUADOR

2012

DEDICATORIA

La culminación de este trabajo se lo dedico principalmente a Dios por brindarme la oportunidad y la dicha de vivir, por acompañarme en cada momento de mi vida, y por sobre todas las cosas por haberme dado la mejor madre del mundo Aída Contero, que con su esfuerzo, dedicación, amor y ejemplo de perseverancia y constancia ha sabido sacarme adelante y guiarme.

A mis hermanos Sandra, Fernando y Jenny por ser los mejores hermanos que pude tener y por el apoyo incondicional brindado a lo largo de toda mi vida.

A mi prima Verito por su apoyo incondicional de siempre.

A mis sobrinos Melanny, Cristopher, Israel y Giselle que llenan de inspiración y alegría cada día de mi existencia.

Es a ustedes a quien va dedicado con mucho amor y cariño todo mi esfuerzo y trabajo puesto para la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTO

A Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, y porque ha hecho realidad este sueño anhelado.

Al Dr. Francisco Portero, director de Tesis, por su alto empeño, dedicación profesional, enseñanzas, confianza y por haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Cumandá Játiva, colaboradora de este trabajo de Tesis por su importante aporte y participación activa en el desarrollo del mismo, por sus consejos, y exigencia que han sido claves para la culminación de este trabajo.

A mi Madre Aída quien ha apoyado y motivado mi formación académica, creyendo y confiando en mí. A mis hermanos por su infinita disponibilidad para apoyarme y ayudarme, Sandra, Fernando, Jenny y Verito.

A Rosita por haber sido una amiga incondicional a lo largo de toda mi carrera y con la que compartimos momentos inolvidables, a Gabriel con el que compartí tiempo de este trabajo de tesis y que ha demostrado ser un gran amigo.

A todos mis entrañables amigos, gracias por estar conmigo, y por formar parte de esta aventura, he aprendido y disfrutado con ustedes mis horas de estudio y trabajo, gracias por esa amistad sincera. Los voy a extrañar.

A mis profesores a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza, un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad forjadora de mi enseñanza.

Y a cada una de las personas que colaboraron de una u otra manera para la culminación de este arduo trabajo de tesis.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal de Tesis certifica que el trabajo de investigación: "**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO Y SUBEXTRACTOS CLOROFÓRMICO Y ETÉREO DE *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia***" de responsabilidad de la señorita egresada Jéssica Adriana Tapia Contero, ha sido prolijamente revisado por los miembros del tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Silvio Alvares L.	-----	-----
DECANO FAC. CIENCIAS		
Dr. Iván Ramos.	-----	-----
DIRECTOR ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA		
Dr. Francisco Portero.	-----	-----
DIRECTOR DE TESIS		
Dra. Cumandá Játiva	-----	-----
MIEMBRO DEL TRIBUNAL		
Tc. Carlos Rodríguez	-----	-----
DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN		
NOTA TESIS	-----	

Yo, Jéssica Adriana Tapia Contero, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la tesis de grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÈCNICA DE CHIMBORAZO

JÉSSICA ADRIANA TAPIA CONTERO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
ADN	Ácido desoxirribonucleico
β	Beta
BNF	Bacilo Gram negativo no fermentadores
°C	Grados centígrados
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ECDA	<i>E. coli</i> difusamente adherente
ECEH	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
ECEI	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
ECEP	<i>E. coli</i> enteropatógena
ECET	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
EMB	Agar Eosina azul de metileno
g	Gramos
INEI	Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
LPS	Lipopolisacáridos
mm	Milímetros
mg	Miligramos
mg/ mL	Miligramo por litro
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
min	Minutos
mL	Mililitros
M.O	Microorganismos
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
MT	Medicina Tradicional
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanometro
O-F	Oxidativo - Fermentativo
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORSA	Oxacilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
P	Parcialmente Activo
PFPs	Producción de Proteínas ligadoras de Penicilina
SIM	Sulfuro Indol Motilidad
SLT	Elaboración de citotoxinas
SST	Síndrome del Shock Tóxico
TSA	Agar Soya Tráptica
TSB	Caldo Soya Tráptica
TSST-1	Toxina del Shock Tóxico
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
μL	Microlitros
μg	Microgramos
VISA	Vancomycin Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

1.	MARCO TEÓRICO	1
1.1.	Medicina Tradicional	1
1.2	Fitomedicina.....	3
1.3	Fitofármacos.....	4
1.4	Formas de preparaciones fitoterápicas	5
1.4.1	Métodos de extracción	5
1.5.	Extractos.....	5
1.6	Principios activos de las plantas medicinales.....	6
1.7	Actividad antibacteriana.....	7
1.8	Grupos principales de componentes antimicrobianos de las plantas	8
1.8.1	Fenoles y polifenoles.....	8
1.8.2	Quinonas.....	10
1.8.3	Flavonas, flavonoides y flavonoles	10
1.8.4	Taninos	11
1.8.5	Cumarinas.....	11
1.8.6	Terpenoides y aceites esenciales	12
1.8.7	Alcaloides.....	12
1.8.8	Lectinas y polipéptidos.....	13
1.9	Antibióticos naturales.....	13
1.9.1	Ventajas de los antibióticos naturales:	13
1.10	Martin galvis (<i>Senna multijuga</i>).....	14
1.10.1	Taxonomía.....	14
1.10.2	Distribución:.....	14
1.10.3	Descripción:	15
1.11	Zorillo(<i>Tagetes zipaquirensis</i>)	16

1.11.1	Taxonomía.....	16
1.11.2	Descripción.....	16
1.11.3	Composición química.....	17
1.11.4	Distribución.....	17
1.11.5	Usos.....	17
1.12	Alberjilla (<i>Coursetia dubia</i>).....	18
1.12.1	Taxonomía.....	18
1.12.2	Descripción y habitat.....	19
1.13	Generalidades sobre estructura y metabolismo de las bacterias.	19
1.13.1	Microorganismos.....	19
1.13.2	La célula bacteriana.....	20
1.13.3	Reproducción bacteriana.....	21
1.13.4	Especies bacterianas.....	21
1.13.5	Metabolismo microbiano.....	22
1.14	Descripción de las bacterias en estudio.....	22
1.14.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.14.1.1	Taxonomía.....	22
1.14.1.2	Descripción y características generales.....	22
1.14.1.3	Características bioquímicas.....	23
1.14.1.4	Características generales de cultivo.....	23
1.14.1.5	Patogenia.....	24
1.14.1.6	Factores de virulencia.....	25
1.14.1.7	Suseptibilidad y resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.14.1.7.3	Resistencia a vancomicina.....	28
1.14.2.	<i>Escherichia coli</i>	28
1.14.2.1	Taxonomía.....	28
1.14.2.2	Descripción y características generales.....	29
1.14.2.3	Características bioquímicas.....	29
1.14.2.4	Características generales de cultivo.....	30
1.14.2.5	Patogenicidad.....	30
1.14.2.6	Suseptibilidad y resistencia de <i>Escherichia coli</i>	32
3.14.2.6.1	Suseptibilidad.....	32
1.14.2.6.2	Resistencia.....	33

1.14.3	<i>Salmonella gallinarum</i>	34
1.14.3.1	Taxonomía.....	34
1.14.3.2	Descripción y características generales	34
1.14.3.3	Patogenia	34
1.14.3.3.1	Signos clínicos.....	35
1.14.3.4	Características bioquímicas	35
1.14.3.5	Características generales de cultivo	36
1.14.3.6	Susceptibilidad y resistencia de <i>Salmonella gallinarum</i>	36
1.14.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	38
1.14.4.1	Taxonomía.....	38
1.14.4.2	Descripción y características generales	39
1.14.4.3	Características bioquímicas	39
1.14.4.4	Características generales de cultivo de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
1.14.4.5	Patogenicidad	40
1.14.4.6	Tratamiento.	40
1.14.4.7	Susceptibilidad y resistencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
1.14.5	<i>Candida albicans</i>	41
1.14.5.1	Taxonomía.....	41
1.14.5.2	Descripción y características generales	41
1.14.5.3	Características bioquímicas	42
1.14.5.4	Características generales de cultivo de <i>Candida albicans</i>	42
1.14.5.5	Patogenicidad	43
1.14.5.6	Susceptibilidad y resistencia de <i>Candida albicans</i>	44
1.14.6.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
1.14.6.1.	Taxonomía.....	44
1.14.6.2	Descripción y características generales	45
1.14.6.3	Características bioquímicas	45
1.14.6.4	Características generales de cultivo de <i>P. aeruginosa</i>	46
1.14.6.5	Patogenicidad	46
1.14.6.6	Susceptibilidad y resistencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
1.15	Métodos de determinación antimicrobiana	48
1.15.1	Método cualitativo.....	49
1.15.1.1	Antibiograma difusión de microdiscos (Kirby-Bauer).....	49

1.15.1.1.1	Indicaciones y limitaciones	50
1.15.2	Método semicuantitativo	51
1.15.2.1	Gradiente antibiotico e-test	51
1.15.3	Métodos cuantitativos	51
1.15.3.1	Método de difusión en disco	51
1.15.3.1.1	Consideraciones sobre el uso de la técnica de difusión en disco	52
1.15.3.2	Métodos de dilución en un medio líquido y en un medio sólido	53
1.15.3.3	Dilución en caldos de cultivo	54
1.15.3.4	Dilución en medio sólido	54
1.16	Otras pruebas para determinar la sensibilidad de las bacterias y la resistencia a los antimicrobianos específicos	55
1.17	Ensayo de actividad antimicrobiana por el método de Mitscher	56
1.18	Estudios científicos y aplicaciones tradicionales	57
2.	PARTE EXPERIMENTAL	60
2.1	Lugar de investigación	60
2.2	Materiales, equipos y reactivos	60
2.2.1	Materiales	60
2.2.1.1	Material vegetal.....	60
2.2.1.2	Material biológico	60
2.2.1.3	Material de laboratorio	61
2.2.2	Equipos.....	62
2.2.3	Reactivos	62
2.3	Métodos y técnicas	64
2.3.1	Recolección	64
2.3.2	Comprobación taxonómica e identificación botánica	64
2.3.3	Procesamiento de materia prima: limpieza y desinfección del material vegetal	65
2.3.4	Obtención de los extractos etanólicos iniciales.....	65
2.3.5	Obtencion de los subextractos.....	66
2.3.6	Determinación de las propiedades organolépticas y físicas de los extractos.....	68
2.3.7	Tamizaje fitoquímico	69
2.3.7.1.1	Ensayo de la espuma	70
2.3.7.2.1	Ensayo del H ₂ SO ₄ concentrado.....	70

2.3.7.2.2	Reacción de Marini bettolo	70
2.3.7.3.1	Ensayo del Cloruro férrico	71
2.3.7.5.1	Ensayo de Borntrager	71
2.3.7.6.1	Ensayo de Dragendorff.....	71
2.3.7.6.2	Ensayo de Wagner.....	71
2.3.7.7.1	Ensayo de Rosenthaler	72
2.3.7.8.1	Ensayo de Baljet.....	72
2.3.7.9.1	Ensayo de Sudan III	72
2.3.7.10.1	Ensayo de Liebermann-Burchard.....	73
2.3.8	Determinación de materia seca de los extractos y subextractos.....	73
2.3.9	Reactivación de cepas microbiologicas ATCC	74
2.3.9.1	Preparación de medios	74
2.3.9.2	Suspensión de microorganismos ATCC	76
2.3.9.3	Siembra de microorganismos ATCC	76
2.3.9.4	Lectura de cajas incubadas	76
2.3.9.5	Almacenamiento de microorganismos ATCC reactivados	77
2.4	Ensayo de la actividad antimicrobiana por el método de Mitscher en los extractos etanólicos de <i>Senna multijuga</i> , <i>Tagetes zipaquirensis</i> , <i>Coursetia dubia</i>	78
2.4.1	Preparación de medios. (día 1).....	78
2.4.2	Preparación de muestras para el ensayo (día 2)	79
2.4.3	Preparación de la siembra (día 3).....	81
2.4.4	Lectura de resultados (días 4 y 5).....	83
3.	Resultados y discusión	85
3.1	Propiedades organolépticas y tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos iniciales de Mantin Galvis (<i>Senna multijuga</i>), Zorillo (<i>Tagetes zipaquirensis</i>), y Alberjilla(<i>Coursetia dubia</i>)	85
3.1.1	Descripcion organoléptica.....	85
4.	CONCLUSIONES	92
5.	RECOMENDACIONES	94
6.	RESUMEN	95
7.	BIBLIOGRAFÍA	98
8.	ANEXOS	111

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Clases de <i>Escherichia coli</i> consideradas como patógenas entéricas, con su fenotipo y patología.....	31
TABLA No. 2	Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana (difusión en agar) de 11 cepas de <i>Salmonella gallinarum</i> y dos de <i>Salmonella pollorum</i>	38
TABLA No. 3	Susceptibilidad antimicrobiana (%) en cepas de <i>K. pneumoniae</i>	41
TABLA No. 4	Respuesta de sensibilidad dosis-dependiente de los aislados clínicos de <i>Candida</i> sp.....	44
TABLA No. 5	Resistencia a los antibióticos en 144 aislamientos clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
TABLA No. 6	Métodos de detección de Antibiosensibilidad.....	49

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Resultados de propiedades y reacciones de coloración de los extractos etanólicos iniciales	85
CUADRO No. 2	Porcentaje de rendimiento de los subextractos etéreos y clorofórmicos de Martín Galvis, Zorillo y Alberjilla.....	87
CUADRO No. 3	Materia seca total presente en los extractos y subextractos de Martín Galvis (<i>Senna multijuga</i>), Zorillo (<i>Tagetes zipaquirensis</i>), y Alberjilla (<i>Coursetia dubia</i>).....	87
CUADRO No. 4	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico inicial de <i>Senna multijuga</i>	88
CUADRO No. 5	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico final y subextractos etéreo y clorofórmico de <i>Senna multijuga</i>	89
CUADRO No. 6	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico inicial de <i>Tagetes zipaquirensis</i>	89
CUADRO No. 7	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico final y subextractos etéreo y clorofórmico de <i>Tagetes zipaquirensis</i>	90
CUADRO No. 8	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de <i>Coursetia dubia</i>	91
CUADRO No. 9	Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico final y subextractos etéreo y clorofórmico de <i>Coursetia dubia</i>	91

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Resistencia en <i>Staphylococcus aureus</i> de la comunidad 1999-2004.....	27
GRÁFICO No. 3	Antibióticos con mayor % de sensibilidad a las cepas <i>E. coli</i>	33
GRÁFICO No. 4	Antibióticos con mediana sensibilidad a las cepas <i>E. coli</i>	33

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Estructura de una bacteria.....	20
FIGURA No. 2	Esquema de preparación de los extractos y subextractos.....	67

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Martin Galvis, <i>Senna multijuga</i>	14
FOTOGRAFÍA No. 2	Zorillo, <i>Tagetes zipaquirensis</i>	16
FOTOGRAFÍA No. 3	Alberjilla, <i>Coursetia dubia</i>	18
FOTOGRAFÍA No. 4	Plantilla del test de Mitscher para el estriado de microorganismos	83
FOTOGRAFÍA No. 5	Tratamiento de lavado de <i>Senna multijuga</i>	111
FOTOGRAFÍA No. 6	Evaporación del contenido de alcohol de los extractos mediante la utilización del rotavapor...	112
FOTOGRAFÍA No. 7	Evaporación del contenido de éter y cloroformo mediante la utilización del rotavapor.	112
FOTOGRAFÍA No. 8	Ensayos de tamizaje fitoquímico realizado a los extractos de <i>Senna multijuga</i> , <i>Tagetes zipaquirensis</i> , y <i>Coursetia dubia</i>	112
FOTOGRAFÍA No. 9	Subextractos etéreos y clorofórmicos de <i>Senna multijuga</i> , <i>Tagetes zipaquirensis</i> , y <i>Coursetia dubia</i>	113
FOTOGRAFÍA No. 10	Reactivación de las cepas conservadas en el área de investigación	113
FOTOGRAFÍA No. 11	Preparación de medios de cultivo para la evaluación de la actividad antimicrobiana.....	114
FOTOGRAFÍA No. 12	Crecimiento microbiano sobre blanco de Agar y DMSO.....	114
FOTOGRAFÍA No. 13	Resultados del test de Mitscher para los extractos etanólicos iniciales en 24 horas de incubación.....	115
FOTOGRAFÍA No. 14	Resultados del test de Mitscher para el extracto etanólico inicial y subextractos de <i>Senna multijuga</i> en 24 horas de incubación.....	115
FOTOGRAFÍA No. 15	Resultados del test de Mitscher para los extractos etanólicos y subextracto etéreo de <i>Tagetes zipaquirencis</i>	116
FOTOGRAFÍA No. 16	Resultados del test de Mitscher para los extractos etanólicos y subextracto etéreo de <i>Coursetia dubia</i> en 24 horas de incubación.....	116

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Tratamiento de lavado de <i>Senna multijuga</i>	111
ANEXO No. 2	Evaporación del contenido de alcohol de los extractos alcohólicos de <i>Senna multijuga</i> , <i>Tagetes zipaquirensis</i> , <i>Coursetia dubia</i>	112
ANEXO No. 3	Evaporación del contenido de éter y cloroformo de los subextractos de <i>Senna multijuga</i> , <i>Tagetes zipaquirensis</i> , <i>Coursetia dubia</i>	113
ANEXO No.4	Tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos iniciales de <i>Senna multijuga</i> , <i>Tagetes zipaquirensis</i> y <i>Coursetia dubia</i>	114
ANEXO No. 5	Subextractos etéreos y clorofórmicos de <i>Senna multijuga</i> , <i>Coursetia dubia</i> y <i>Tagetes zipaquirensis</i>	113
ANEXO No. 6	Reactivación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637, <i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.....	114
ANEXO No. 7	Preparación de medios de cultivo para la evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos y subextractos mediante test de Mistcher.	114
ANEXO No. 8	Crecimiento microbiano sobre blanco de Agar y DMSO.....	115
ANEXO No. 9	Resultados del test de Mitscher para el extracto etanólico inicial y subextractos de <i>Senna multijuga</i> en 24 horas de incubación.	115
ANEXO No. 10	Resultados del test de Mitscher para los extractos etanólicos y subextracto etéreo de <i>Tagetes zipaquirensis</i> en 24 horas de incubación.....	116
ANEXO No. 11	Resultados del test de Mitscher para los extractos etanólicos y subextracto etéreo de <i>Coursetia dubia</i> en 24 horas de incubación...	116

INTRODUCCIÓN

La mayoría de enfermedades infecciosas han sido azotes de la humanidad a lo largo de toda su historia, causando con frecuencia estragos en las poblaciones con más eficacia que las guerras. No más de seis enfermedades mortales (la neumonía, la tuberculosis, las enfermedades diarreicas, el paludismo, el sarampión, y más recientemente el VIH/SIDA) provocan más de la mitad de todas las defunciones prematuras, causando sobre todo la muerte de niños y adultos jóvenes. Cada tres segundos muere un niño, y en la mayoría de los casos por una enfermedad infecciosa, el uso de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades incluidas las de etiología infecciosa constituye un desafío en la medicina.

Los bacilos Gram-negativos como *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, causan principalmente enfermedades respiratorias, *Escherichia coli*, enfermedades urinarias y diarreicas, los estafilococos se han reconocido como causas de enfermedades piógenas desde los primeros tiempos de la microbiología principalmente en infecciones postquirúrgicas y obstétricas graves, con frecuencia mortales, además la candidiasis es la más frecuente de las micosis sistémicas, y causa alrededor del 25% de todas las muertes dependientes de hongos.

La variedad de familias de antibióticos y vías de administración disponibles actualmente ofrecen un arsenal terapéutico dirigido a las enfermedades infecciosas más comunes y permite además disponer de tratamientos alternativos en caso de alergia o resistencias. El método de elección cuando se trata de probar la actividad antimicrobiana en extractos de plantas es la Técnica de Mitscher.

Por lo tanto, el propósito principal de este estudio etnobotánico, fitoquímico y microbiológico empieza por la preparación de los extractos etanólicos y subextractos clorofórmico y etéreo de Mantin Galvis (*Senna multijuga*), Zorillo (*Tagetes*

zipaquirensis), y Alberjilla (*Coursetia dubia*), seguida de la identificación los grupos fitoquímicos presentes en los extractos etanólicos, y finalmente la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y subextractos mediante el método de Mitscher, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC No.6538, *Escherichia coli* ATCC No 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC No.9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC No.10031, *Candida albicans* No 10231, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC No. 27853.

Los resultados obtenidos realizados mediante el Método del Test de Mitscher demuestran que de la *Senna multijuga*; el subextracto etéreo de dicho vegetal presenta actividad inhibitoria para *Staphylococcus aureus*; el subextracto clorofórmico presenta actividad parcial para *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*. En lo que se refiere a *Tagetes zipaquirensis* el extracto etanólico inicial tiene actividad para *Candida albicans*, de igual manera el subextracto etéreo presentó actividad inhibitoria para 5 cepas de microorganismos estudiados, siendo este únicamente inactivo para *E. coli*. El extracto etanólico inicial, extracto etanólico final y subextracto etéreo de *Coursetia dubia* presentó actividad parcial para *Candida albicans*.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 MEDICINA TRADICIONAL

La primera visión del hombre primitivo fue un mundo vegetal de una increíble riqueza donde halló con que alimentarse, vestirse y protegerse de la intemperie y atender a su salud. Desde siempre el hombre lucha contra la enfermedad y contra la muerte y utiliza las plantas medicinales, el remedio que recibió como un precioso don desde su aparición sobre la tierra, las plantas medicinales constituyen la medicina más antigua y la más natural, pues proviene directamente de la naturaleza. (79)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la Medicina Tradicional (MT) en los siguientes términos: “prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir enfermedades.”(10) (85)

La medicina natural, o naturismo, es un método curativo que utiliza múltiples medios naturales para permitir que el individuo pueda adquirir un nivel máximo de salud. Los conocimientos médicos ancestrales se han difundido mediante el aprendizaje teórico y práctico, por medio de la observación y la experimentación, a partir de la repetición exacta de sus principios e, igualmente, de las innovaciones que algunos individuos introducen gracias a su propia experiencia. (75)

América Latina y particularmente Ecuador, son espacios geográficos poblados por múltiples culturas donde las Medicinas Ancestrales, tienen un espacio importante pese al menosprecio demostrado por la cultura mestiza dominante. (13)

Las estadísticas demuestran que del 100% de ecuatorianos, el 43% tiene algún problema de salud, sin embargo, solo el 37% acudió a un servicio de salud, mientras un 48% se auto médico. Probablemente un gran porcentaje de quienes se auto medican, lo hace recurriendo al uso de las Medicinas tradicionales. (3) (13)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) afirma que más del 80% de la población del mundo usa alguna forma de Medicina Tradicional, complementaria o alternativa para tratarse en el nivel primario. (85)

El Ecuador es uno de los países que cuenta con el mayor número de especies por superficie de área, y está ubicado en el sexto lugar a nivel mundial en megadiversidad. (14) (49)

Muchas investigaciones acerca el uso medicinal de especies vegetales andinas se ha llevado a cabo con la intención de que los ecuatorianos las incorporen en su cotidianidad y usen plantas como sustitutas a las medicinas convencionales. (32)

Dentro de las categorías medicinales, las infestaciones e infecciones están representadas por el 26% de las plantas utilizadas con propósitos medicinales y tratan afecciones causadas por bacterias, virus, hongos, protozoos, platelmintos, nematodos, anélidos y artrópodos. Pero la utilidad de una planta tiene también límites geográficos; muchas especies son solamente útiles donde crecen de manera natural y no pueden ser movidas de su sitio sin perder su capacidad de adaptación. (4) (20) (49)

Es prioritario reportar que casi el 25% de los medicamentos que se comercializan en el mundo son derivados total o parcialmente de especies vegetales. Una ilustración demostrativa de lo anterior es el trabajo de Farnsworth (1988), quien investigó 119 drogas obtenidas a partir de plantas que son usadas en la medicina convencional y

encontró que el 77% de ellas fueron descubiertas a partir de la Etnomedicina de diferentes pueblos indígenas. (14) (20)

1.2 FITOMEDICINA

La OMS, define la Fitomedicina como la aplicación de principios activos de origen vegetal en terapéutica, basado en el conocimiento científico moderno, esto es una base que se sostiene en los pilares fundamentales de la farmacología y la terapéutica moderna: farmacodinamia, farmacocinética, estudios preclínicos, clínicos y la divulgación de éstos a través de medios reconocidamente validados por las comunidades científicas.(29)

La Fitoterapia Moderna o Fitomedicina, se nutre del desarrollo de la Fitofarmacología básica y clínica, esto es de los estudios farmacológicos realizados con plantas o sus componentes y lo que la lleva a fundamentarse en el uso racional y científico de productos vegetales con finalidad terapéutica; puede así ser utilizada para prevenir, curar o anular estados patológicos.(14) (32)

Los profesionales de la salud en su mayoría no reciben una formación que les permita analizar científicamente este tipo de recursos terapéuticos de modo tal que les permita incluirlos o descartarlos en el tratamiento de sus pacientes. A lo anterior se suma que en general la tendencia de estos profesionales es a descalificar y/o desechar la utilización de medicamentos a base a plantas (fitomedicamentos) por desconocimiento de la literatura pertinente como asimismo de sus indicaciones, posología y efectos adversos.(14)

En el mundo hace más de treinta años que se ha vuelto a considerar el tratamiento fitoterapéutico de las enfermedades comunes como el resfrío, la hipertensión, la diabetes, el cáncer, enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), dolor (lumbago, dolor de cabeza, artrosis), y alteraciones del sistema nervioso central, epilepsia, depresión, ansiedad, estrés, entre otras. El surgimiento de gran diversidad de estudios científicos ha venido a sostener firmemente que este tipo de enfermedades o los síntomas que ellas producen, pueden ser tratados con la Fitoterapia Moderna.(27) (29) (32)

Se hace necesario capacitar profesionales de la salud, para que puedan utilizar y/o comprender los alcances de la Fitoterapia Moderna o Fitomedicina de modo que a través del uso de sus herramientas terapéuticas puedan contribuir a mejorar la atención de pacientes y en cuanto a lo cultural, los lleve a incrementar el conocimiento de tradiciones etnomedicinales arraigadas en nuestra población, lo que sin duda contribuirá a reforzar la prevención y el tratamiento de las enfermedades. (27)

1.3 FITOFÁRMACOS

El fitofármaco es un medicamento extraído de una planta medicinal. El término proviene del griego *phytos* planta y *pharmakon* remedio. Aunque el extracto obtenido de una especie vegetal se compone de toda una serie de principios activos, éste es considerado como un solo fármaco, ya que su efecto radica en la acción combinada de sus componentes. (22)

En los fitomedicamentos se reúne el conocimiento ancestral etnobotánico y etnomédico; a estos aspectos, se les suma el moderno conocimiento farmacológico básico y clínico. De esta forma, se continúa el uso de la planta medicinal, ahora en forma de extracto estandarizado y con el respaldo de toda la tecnología farmacéutica actual. (27)

El uso de plantas con fines terapéuticos presupone la elaboración de diversas formas farmacéuticas que pueden abarcar desde la infusión más simple hasta las más sofisticadas cremas, pomadas, geles, etc. Para llegar a ello se requiere un largo proceso con implicación de especialistas de diferentes ramas, pero sin lugar a dudas el punto de partida radica en la identificación y recolección correcta de la masa verde a trabajar. La participación de botánicos o personal debidamente entrenado es esencial ya que no solamente es necesario conocer cada planta sino también se hace imprescindible el dominio de otros elementos que pueden modificar sus propiedades. Así, hay que tener en cuenta los factores que afectan la dinámica de acumulación de los principios activos. (33)

1.4 FORMAS DE PREPARACIONES FITOTERÁPICAS

1.4.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Los principales activos contenidos en las plantas pueden ser extraídos mediante diversas técnicas extractivas o bien pueden ser administrados como tales, en la planta desecada o en la planta fresca. (76)

A lo largo de la historia la fitoterapia ha desarrollado diversos métodos de extracción para el mejor aprovechamiento de las virtudes terapéuticas de las plantas tratadas. El método de extracción utilizado depende del tipo de planta a emplear (caracteres organolépticos), de la concentración de principios activos y de sus propiedades farmacológicas. (82) (87)

1.5 EXTRACTOS

Los extractos son preparaciones todavía más concentrados que las tinturas. Se basan en el principio de que las sustancias como el agua o el alcohol pueden disolver las sustancias curativas de las plantas, así tenemos que hay extractos hidroalcohólicos y extractos puramente acuosos. Los extractos hidroalcohólicos tienen la ventaja que se les puede calcular en dosis exactas. Así, 1 mL de extracto fluido representa un gramo de la droga en polvo. (68)

Se puede elevar la concentración de principios activos procedentes de una tintura, cocimiento o jugo de las plantas por medio de la evaporación del disolvente, sea alcohol o sea agua. (8)

Mediante calor y evaporación con baño María se logra que el extracto tome diferentes consistencias, pueden quedar blandos como la miel, secos como polvo y líquidos o fluidos. (60)

Dado que esta evaporación dañaría y alteraría los principios activos, deberá siempre hacerse al vacío, con lo cual se consigue que la evaporación se haga a una temperatura que no supere los 50°C, ya que el punto de ebullición de un líquido depende de la presión a la que esté sometido. (8) (78)

Disminuyendo esta presión, vacío o presión negativa se consigue disminuir el punto de ebullición. Así, se pueden concentrar más o menos las preparaciones extractivas, pudiéndose llegar incluso al extracto seco, que es el más concentrado. Por estos métodos, se pierden los aceites esenciales de la planta, al evaporar. (6)

Existen diversos aparatos para tal efecto, dependiendo del resultado que se quiera conseguir:

- Concentradores a vacío.
- Nebulizadores o atomizadores.- Producen una evaporación instantánea haciendo atomizar el líquido a través de una corriente de aire caliente. Así se obtienen los nebulizados.
- Liofilizadores.- Consiste en enfriar a muy bajas temperaturas, por medio de una potente fuente de vacío el disolvente solidificado por el frío, pasa directamente a vapor, sin pasar por estado líquido. A este proceso se le llama sublimación y así se obtienen los liofilizados. (8) (78) (80) (87)

1.6 PRINCIPIOS ACTIVOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Se conoce como Principio activo a toda sustancia química responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico de una droga. Los principios activos más importantes desde el punto de vista médico son los alcaloides y los glucósidos. (1)

Las plantas presentan una amplia gama de sustancias químicas, cuyos principios activos pueden o no ser de utilidad como medicamento y encontrarse en toda su estructura o sólo en algunas secciones, además de que su concentración y calidad dependen de diversos

factores como la edad del vegetal, el clima, la época del año, entre otros. Un solo vegetal puede actuar como fitofármaco completo o como principios activos individualizados. (9)

Se estima que en la parte aérea de las plantas, la filosfera y especialmente en las hojas, existen alrededor de 10^6 - 10^7 células/cm² (10^8 células/g) de microorganismos, principalmente bacterias. Esta diversidad tan rica resulta de un proceso evolutivo conducido para la adquisición de defensa mejorada frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales. Estas sustancias se pueden dividir básicamente, en dos grandes grupos: fitoanticipinas, que están presentes de forma constitutiva en las plantas, y fitoalexinas, cuya presencia aumenta de forma considerable en respuesta a la invasión microbiana. (8) (71)

Los principios activos se clasifican, según su estructura química, en grupos siendo unos productos resultantes del metabolismo primario (procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción): Glúcidos, lípidos, derivados de aminoácidos y otros productos derivados del metabolismo secundario (no son esenciales para el metabolismo sino que son sintetizadas como defensa, adaptación, etc) son los más importantes como principios activos. (4)

- Heterósidos.** Antraquinónicos, Cardiotónicos, Cianogénicos, Cumarínicos, Fenólicos, Flavónicos, Ranunculósidos, Saponósidos, Sulfurados
- Polifenoles.** Ácidos fenólicos; Cumarinas; Flavonoides; Lignanós; Taninos; Quinonas.
- Terpenoides.** Aceites esenciales; Iridoides; Lactonas; Diterpenos; Saponinas.
- Alcaloides** (6)

1.7 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se define como “La capacidad que posee un Fármaco o compuesto natural de inhibir el crecimiento de microorganismos”. Generalmente los compuestos que poseen dicha actividad tienen gran interés a nivel mundial, ya que con ellos se puede controlar y hasta eliminar las infecciones provocadas por los microorganismos. (53)

1.8 GRUPOS PRINCIPALES DE COMPONENTES ANTIMICROBIANOS DE LAS PLANTAS

Las plantas tienen una casi ilimitada habilidad de sintetizar sustancias aromáticas, gran cantidad de ellas son fenoles o sus derivados de oxígenos sustituidos. Muchos son metabolitos secundarios de los cuales por lo menos 12000 han sido aislados, un número estimado menor en un 10% del total. (6)

En numerosos casos estas sustancias sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra la predación por microorganismos, insectos y herbívoros. Algunos, tales como los terpenoides, dan a las plantas sus olores; otros (quinonas y taninos) son responsables del pigmento de las plantas. Muchos componentes son asimismo responsables del sabor de las plantas (el terpenoide capsaicina en caso del ají), y algunas de las hierbas y especies usados por los humanos para sazonar los alimentos producen compuestos medicinales útiles. (36)

Los compuestos fitoquímicos antimicrobianos útiles pueden ser agrupados en varias categorías, como las siguientes:

1.8.1 FENOLES Y POLIFENOLES

El ácido cafeico y el cinámico son representantes de estos grupos, ambos con acción antimicrobiana, antiviral y antifúngica, también se pueden mencionar a los fenoles simples y ácidos fenólicos, catecoles y eugenoles (estos últimos considerados bacteriostáticos). La actividad antimicrobiana del catecol y del pirogallol está directamente relacionada con el número de grupos hidroxilos que tiene el derivado fenólico. También están las quinonas (como las antraquinonas con acción bactericida para *Pseudomonas*), flavones, flavonoides, flavonoles y catequinas. Parte de los flavonoides inhiben in vitro el crecimiento de *V. cholerae*, *Streptococcus* y otras bacterias. Los flavonoides también exhiben actividad antiviral; los taninos presentan actividad astringente. Se considera que la acción de los fenoles y polifenoles contra los microorganismos se debe a la inhibición enzimática posiblemente por acción sobre los

grupos sulfhidrilos de sus aminoácidos de cisteína o por medio de reacciones más inespecíficas con proteínas bacteriana. Los compuestos fenólicos que poseen una cadena lateral a nivel de C3 en un bajo nivel de oxidación y que no contienen oxígeno, son clasificados como aceites esenciales y a veces se citan como agentes antimicrobianos bacteriostáticos contra hongos y bacterias. (35)(36)

Katsura y col. (2001) purificaron bakuchiol (monoterpeno fenólico) a partir de semillas de *Psoralea corylifolia* y en solución con DMSO al 5%. El análisis de la actividad antimicrobiana se realizó leyendo absorbancias a 610 nm (turbidez) de cultivos microbianos incubados por 24 horas. Para determinar un posible crecimiento posterior al enfrentamiento con bakuchiol (conteo de células viables), se tomaron alícuotas de estas muestras diluidas en presencia de Tween 80 (para inactivar el bakuchiol) y se sembraron en placa, incubándose por 48 horas para leer Unidades Formadoras de Colonias (UFC). (38) (34)

Hubo una inhibición de crecimiento de *S. mutans* directamente proporcional a la concentración de bakuchiol, encontrándose una actividad bacteriostática in vitro a una concentración de 5 µg/ml y una actividad bactericida in vitro a 20 µg/ml. El efecto bactericida del bakuchiol fue dependiente del tiempo y la producción de glucanos insolubles en agua (principal factor de virulencia para *S. mutans*) fue prácticamente inhibida. (38)

También se analizó la actividad antimicrobiana del bakuchiol contra diferentes especies de bacterias, incluyendo *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *Actinomyces viscosus*, generando diversos valores del MIC que van desde 1.0 hasta 4.0 µg/ml y una concentración esterilizante entre los 5.0 hasta los 20.0 µg/ml. (38)

1.8.2 QUINONAS

Son anillos aromáticos con dos sustituciones cetónicas. Se encuentran en amplia distribución en la naturaleza y son altamente reactivos en reacciones de óxido-reducción. Producen radicales libres y generan complejos irreversibles con aminoácidos nucleofílicos de las proteínas, generando su inactivación. El rango de la actividad antimicrobiana de las quinonas es amplio, actuando posiblemente sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas unidas a membranas. Por ejemplo, una antraquinona proveniente de *Cassia italica*, un árbol de Paquistán, tiene acción bacteriostática sobre *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium pseudodiphthericum* y *Pseudomonas aeruginosa*, y tiene acción bactericida sobre *Pseudomonas pseudomalliae*. La Hipericina es una antraquinona extraída de *Hypericum perforatum* que ha sido descrita como un antidepresivo, pero tiene también actividades antimicrobianas. (38)

Plantas de la familia Borraginácea se han caracterizado por producir naftoquinonas en sus raíces, las cuales han sido utilizadas en numerosas culturas indígenas como colorantes en cosméticos y alimentos, y para aplicaciones medicinales por su actividad antitumoral, antiinflamatoria y antimicrobiana. (36) (38)

1.8.3 FLAVONAS, FLAVONOIDES Y FLAVONOLES

Son estructuras fenólicas que contienen un solo grupo carbonilo. Estos compuestos son sintetizados por las plantas en respuesta a la infección antimicrobiana, y su actividad sobre las bacterias probablemente se deba a su capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles, así como una actividad sobre la pared celular muy similar a la de las quinonas. Los flavonoides lipofílicos pueden perturbar la integridad estructural de la membrana.

Las catequinas derivados de los flavonoides, han sido estudiadas como los compuestos que generan la actividad antimicrobiana in vitro en el té verde, sobre *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans* y *Shigella*, principalmente. Las catequinas tienen una actividad

inactivadora sobre la toxina de *Vibrio cholerae* e inhibe las glicosil transferasas en *S. mutans*. Ratas de laboratorio que recibieron en su dieta 0.1 % de catequinas del té, redujeron en un 40% la presencia de caries inducida. (35)

1.8.4 TANINOS

Conforman un grupo de sustancias fenólicas poliméricas capaces de precipitar gelatina en solución, una propiedad conocida como astringente. Están divididas en dos grupos: hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables están basados en el ácido gálico, usualmente como ésteres múltiples con la D-glucosa, mientras que los taninos condensados más importantes (a veces llamadas proantocianidinas) son derivados de monómeros flavonoides. (35)

Se ha considerado que los taninos, en muchas bebidas como el té verde y el vino, tienen actividades reforzadoras de la salud (estimulación de la actividad fagocitaria, actividad antitumoral mediada por el hospedero y un amplio rango de actividad antiinfecciosa). En las plantas, los taninos tienen una acción inhibitoria del crecimiento de insectos y perturban la digestión de rumiantes. Se cree que la actividad antimicrobiana de estos compuestos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacáridos. (35)

Las plantas de las especies de *Vaccinium* contienen taninos condensados llamados proantocianidinas. Estas sustancias son compuestos fenólicos estables que pueden prevenir la expresión de las fimbrias P de *E. coli* dentro de sus actividades antibacterianas, y además tienen actividades antivirales, antiadherentes o antioxidantes.(35)

1.8.5 CUMARINAS

Son compuestos de los cuales se conoce muy bien su acción antitrombótica, antiinflamatoria y vasodilatadora. Un gran ejemplo de estos compuestos es la warfarina, usada como un anticoagulante oral y como un rodenticida. Se ha visto que tiene acción

antiviral, asimismo, otras cumarinas tienen actividad antimicrobiana sobre *Candida albicans* ya se han realizado trabajos in vivo en conejos. Estos trabajos fueron realizados en vista de las crónicas que, en 1954, indicaban el uso de cumarinas en lavados vaginales para el tratamiento de candidiasis en mujeres gestantes. Sin embargo, su uso interno es discutido por sus efectos contraceptivos en animales. (35)

1.8.6 TERPENOIDES Y ACEITES ESENCIALES

Los terpenos o terpenoides son activos contra bacterias, virus, hongos y protozoarios. Se ha reportado que los terpenoides actúan contra *Listeria monocytogenes*. Se cree que esta actividad antimicrobiana se debe a una perturbación de la estructura de la membrana celular por su naturaleza lipofílica. La capsaicina tiene actividad bactericida sobre *Helicobacter pylori*; aunque tiene un poder muy irritante sobre la mucosa gástrica, se ha demostrado que afecta el sistema nervioso, el cardiovascular y el digestivo. Se ha sugerido que la capsaicina también podría incrementar el crecimiento de *Candida albicans*.

El ácido betulínico es un triterpenoide que muestra actividad inhibitoria del virus VIH. El petalostemumol presenta una actividad excelente contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, aunque tiene una menor actividad sobre bacterias Gram negativas y *Candida albicans*. Por otro lado, los terpenos previenen la formación de úlceras gástricas y disminuyen la severidad de las úlceras existentes, aunque no se sabe a ciencia cierta si esta actividad se debe o no a su acción antimicrobiana. (35)

1.8.7 ALCALOIDES

Los Glicoalcaloides de especies de *Solanum* podrían ser útiles contra la infección por VIH y también contra las infecciones intestinales relacionadas con el SIDA. Otros alcaloides tienen efecto contra parásitos como *Giardia* y *Entamoeba*. La berberina es un alcaloide representativo por su actividad potencialmente efectiva contra *Tripanosoma* y *Plasmodium*. Se ha descrito que tiene actividad microbicida (por ejemplo, sobre *Giardia*

y *Entamoeba*), pero se cree que su acción antidiarreica probablemente se deba a sus efectos sobre el tiempo de tránsito del bolo alimenticio en el intestino delgado. (35)

1.8.8 LECTINAS Y POLIPÉPTIDOS

La actividad antimicrobiana de los péptidos fue descrita por primera vez en 1942. Tienen a veces grupos con carga positiva y contienen enlaces disulfuro entre residuos de cisteína. Su mecanismo de acción principalmente se explica como la formación de canales iónicos en la membrana del microorganismo o la inhibición competitiva de la adhesión de proteínas a los receptores polisacáridos del hospedero. Un reciente interés se ha enfocado en estudiar la actividad anti-VIH de péptidos y lectinas. Las tioniinas son péptidos tóxicos para levaduras y bacterias Gram positivas y Gram negativas. (35)

Los péptidos cíclicos son pequeños en tamaño y número de aminoácidos (por lo general menos de 15 aminoácidos) y son sintetizados por bacterias y plantas. También se han encontrado péptidos grandes cíclicos unidos por los extremos de 29 a 31 aminoácidos en plantas de la familia Rubiaceae (café).

1.9 ANTIBIÓTICOS NATURALES

Los antibióticos naturales son simplemente algunos vegetales o minerales, que podemos encontrar en la naturaleza, que actúan inhibiendo el crecimiento y el desarrollo normal de microorganismos. De esta manera, prevenimos y hasta podemos curar muchas enfermedades y condiciones médicas problemáticas. (38)

1.9.1 VENTAJAS DE LOS ANTIBIÓTICOS NATURALES:

1. Por lo general carecen de efectos secundarios
2. Rara vez causan alergias
3. Eliminan únicamente microorganismos que son nocivos para el cuerpo
4. Precio barato y fáciles de encontrar. (77)

1.10 MARTIN GALVIS (*Senna multijuga*)



FUENTE: <http://www.henrietteesherbal.com> (81)
FOTOGRAFIA No. 1 MARTIN GALVIS, *Senna multijuga*

1.10.1 TAXONOMIA

Es un género de la familia Fabaceae con alrededor de 250 especies.

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Fabales Bromhead

Familia: Fabaceae Lindl.

Género: *Senna*

Especie: *multijuga* (L. C. Rich.)

1.10.2 DISTRIBUCIÓN:

Es nativo de todas las regiones tropicales con alguna de las especies distribuidas por las regiones templadas. (29)

Se presenta también en la vertiente del Golfo de México desde el sur de Hidalgo hasta el norte de Chiapas. Es abundante en la vegetación secundaria derivada de selvas altas o medianas perennifolias y subperennifolias.

1.10.3 DESCRIPCIÓN:

CORTEZA: Externa lisa, pardo grisácea, con numerosas lenticelas protuberantes dispuestas en líneas horizontales. Interna pardo verdosa, ligeramente fibrosa de sabor muy amargo, exuda un jugo verde amarillento. Grosor de la corteza de 7 a 8 mm.

HOJAS: Dispuestas en espiral, paripinnadas, de 5 a 13 cm de largo incluyendo el peciolo, compuestas por 20 a 50 pares de folíolos opuestos subsésiles; laminas lineares con margen entero y revoluto, ápice redondeado y mucronado. Haz verde opaco y ligeramente glauco en el envés con el margen pubescente.

FLOR: En panículas o racimos axilares y terminales de 5 a 10 cm de largo, zigomorfas de 1.5 a 2.5 cm de diámetro, de color amarillo. Florecen de julio a enero.

FRUTO: Vainas de 10 a 15 cm de largo y de 1.5 a 2 cm de ancho, aplastadas con numerosas septos angostos y paralelos, negras y glabras, cada septo contiene una semilla aplastada de 1 cm de largo, de color pardo brillante. Fructificación de noviembre a febrero.

1.10.4 USOS

Se emplea frecuentemente como árbol de ornato. (56)

1.11 ZORILLO (*Tagetes zipaquirensis*)



FOTOGRAFIA No. 2 ZORILLO, *Tagetes zipaquirensis*

1.11.1 TAXONOMÍA

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribus: Tageteae

Género: *Tagetes*

Especies: *zipaquirensis*

1.11.2 DESCRIPCIÓN

Es una hierba anual de la familia de las Asteráceas, puede alcanzar hasta 50 cm de alto, las hojas son de color verde, y son pinadas diseccionado en 4 a seis pares de pinnas.

Posee glándulas multicelulares de color anaranjado, que emanan un aroma repugnante cuando se rompe, también se pueden encontrar en los tallos y brácteas del involucre. Hay típicamente 3 a 5 de color amarillo-naranja. Las cabezas son pequeñas, de 10 a 15 mm de largo, incluyendo rayos florales, de 10 a 20 mm de diámetro. (45)

1.11.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA.

El aceite esencial contiene dehidrotagetona, β - ocimeno y tagenona. La composición química del aceite varía según las diferentes partes de la planta y de su estadio de crecimiento. Como compuestos secundarios, tenemos acíclicos y bicíclicos monoterpenos monocíclicos, sesquiterpenos, flavonoides, tiofenos, y los compuestos aromáticos. (61)

1.11.4 DISTRIBUCIÓN

El Zorillo es nativa de los pastizales templados y regiones montañosas del sur de Sudamérica, incluye Argentina, Chile, Bolivia, Ecuador, Perú, se encuentra a menudo creciendo en las zonas de disturbios durante las etapas iniciales de sucesión.

Esta afinidad por los sitios perturbados a permitido a la especie para colonizar muchas áreas alrededor de mundo.

Desde la época de la conquista española se ha introducido en Europa, Asia, África, Madagascar.

1.11.5 USOS

Se usa en la gastronomía peruana como condimento en la preparación de ajíes, guisos y asados. Es un ingrediente indispensable en la preparación de la Ocopa en salsa de ají, cebolla, ajo y maní típica de la región de Arequipa. Es uno de los componentes del aderezo del pollo a la brasa, donde cada establecimiento hace su propia variación, muchas veces guardada como secreto. (61)

1.12 ALBERJILLA (*Coursetia dubia*)



FUENTE: [http://intermountainbiota.org/portal/taxa/index.php?taxon=152975\(73\)](http://intermountainbiota.org/portal/taxa/index.php?taxon=152975(73))

FOTOGRAFIA No. 3 ARVERJILLA, *Coursetia dubia*

1.12.1 TAXONOMÍA

Dominio: Eucariontes- Whittaker y Margulis, 1978

Reino: Plantae - Haeckel, 1866

Plantas Subreino: Viridaeplantae - Cavalier-Smith, 1981.

Filo: Tracheophyta - Sinnott, 1935 ex Cavalier-Smith, 1998 - Plantas Vasculares.

Subphylum: Euphylllophytina

Clase: Magnoliopsida - Brongniart, 1843 – Dicotiledóneas

Subclase: Rosidae- Takhtajan de 1967

Superorden: Rosanae- Takhtajan de 1967

Orden: Fabales - Bromhead de 1838

Familia: Leguminosae

Género: *Coursetia*

Especie: *dubia* (60)

1.12.2 DESCRIPCIÓN Y HABITAT

Este arbusto rastrero presenta hojas generalmente alternas, pinnadas, compuestas y con estípulas. Las flores, presentes de diciembre a mayo, son de color rosado, se vuelven blancas con la edad y atraen a abejas para la polinización. Los frutos son legumbres planas con semillas pequeñas. Su hábitat natural incluye los bosques secos; se la encuentra en laderas y bordes de caminos. Esta especie es endémica para el Ecuador, bajo la categoría de “casi amenazada” para extinguirse debido a que la vegetación natural es remplazada por potreros y cultivos. Esta especie se encuentra protegida en la Reserva Geobotánica Pululahua y se distribuye en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Chimborazo, Tungurahua, Cañar y Azuay entre los 1800-3100 m.s.n.m. Se usa como forraje de ganado y como planta ornamental. Presenta usos medicinales relacionados con el corazón y los riñones. (84)

1.13 GENERALIDADES SOBRE ESTRUCTURA Y METABOLISMO DE LAS BACTERIAS.

1.13.1 MICROORGANISMOS

Las bacterias, hongos, protozoos y virus, viven en la naturaleza como parásitos y ejercen sobre el hospedador una acción que nunca será inofensiva o indiferente, sino perjudicial en grado variable. El conocimiento de estos microbios ha permitido determinar el verdadero origen y desarrollo (etiología y patogenia) de un gran número de enfermedades que tienen carácter infeccioso o contagioso, de gran morbilidad y mortalidad; se transmiten en general de forma epidémica afectando simultáneamente a un gran número de población. Actualmente, las enfermedades infecciosas han cobrado un inusitado interés por la aparición de nuevos procesos y la aparición de otros clásicos ya casi olvidados; el progreso de la Medicina con la introducción de nuevas y eficaces técnicas diagnósticas y terapéuticas ha multiplicado la frecuencia de la llamadas infecciones nosocomiales. (16)

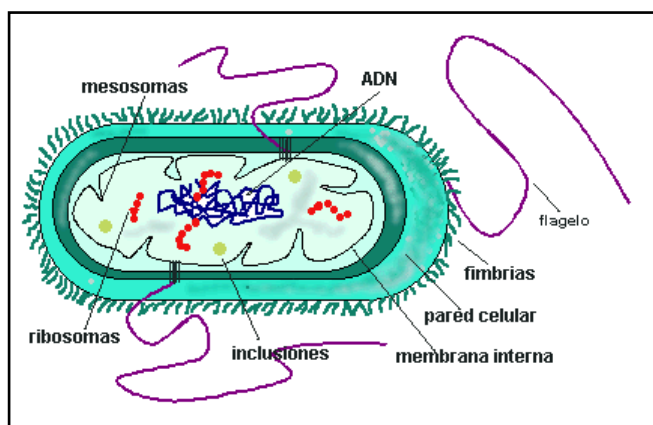
La taxonomía se ordena por escalones jerárquicos: reino, división, clase, orden, tribu, familia, género, especie.

Las bacterias se consideran protistas (unicelulares) pertenecientes al reino de los Procariotas, seres caracterizados por no poseer un verdadero núcleo, sino una formación nuclear sin membrana, pero si tienen pared celular (prácticamente todos); los hongos unicelulares y protozoos se incluirán dentro de los Eucariotas. (16)

El reino Procariota tiene dos divisiones:

1. Cianobacterias, son las bacterias verde azuladas que poseen pigmentos similares a la clorofila.
2. Bacterias, donde se engloban cuatro divisiones:
 - Gracilicutes: pared celular de contenido lipídico (gramnegativas).
 - Firmacutes: pared celular firme (grampositivas)
 - Mollicutes: pared celular blanda(sin pared celular)
 - Mendocutes: pared incompleta (16)

1.13.2 LA CÉLULA BACTERIANA



FUENTE: <http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Bacteria.htm>(58)

FIGURA No. 1 ESTRUCTURA DE UNA BACTERIA

Las bacterias son organismos unicelulares muy pequeños y relativamente sencillos, cuyo material genético no está rodeado por una membrana nuclear especial, por ello se llaman procariotas. (18)

1.13.3 REPRODUCCIÓN BACTERIANA

Las bacterias se reproducen habitualmente de forma asexual por división transversal o esquizogénesis (división binaria), originándose por estrangulamiento de la célula madre dos células hijas. Pueden también reproducirse sexualmente mediante conjugación, en la cual la bacteria dadora o macho se une mediante un pili a la receptora e introduce en esta un ADN lineal, transformándola en célula diploide (doble cromosoma) que, posteriormente, dará origen a dos células hijas.

La esporulación es otra forma de reproducción asexual en donde la espora formada da lugar a una futura célula hija.

Las bacterias se consideran como agregados más que como individuos aislados. Al reproducirse, aumentan en cantidad y masa celular. (16)

1.13.4 ESPECIES BACTERIANAS

Actualmente muchos agentes patógenos causantes de infecciones nosocomiales y comunitarias presentan resistencia a los diversos antimicrobianos, por lo que se han convertido en un grave problema en todo el mundo. Los laboratorios de microbiología clínica siempre han realizado pruebas de sensibilidad de los aislamientos bacterianos a los diferentes antimicrobianos, sin embargo, hoy en día su función es mucho más amplia, debe incluir la vigilancia de esta resistencia. (41)

Los microorganismos aislados con mayor frecuencia son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* En la vigilancia de resistencia es fundamental conocer los patrones de sensibilidad de los patógenos provenientes de la comunidad y de los hospitalarios. En el primer grupo están *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Shigella* y *Salmonella*. Y dentro del grupo de bacterias hospitalarias están *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterococcus spp.* (40)

1.13.5 METABOLISMO MICROBIANO

El crecimiento microbiano requiere la formación de estructuras bioquímicas complejas como proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos a partir de elementos preformados en el medio de crecimiento o ser sintetizados por la propia célula; a su vez, este crecimiento necesita de una fuente de energía para ser llevado a efecto; todo este proceso se designa con el nombre de metabolismo, que se define como todas las transformaciones químicas que ocurren en una célula. (12)

1.14 DESCRIPCIÓN DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO

1.14.1 *Staphylococcus aureus*

1.14.1.1 TAXONOMÍA

Reino	Bacteria
Phillum	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Micrococcaceae
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>aureus</i> (2)

1.14.1.2 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

Es una bacteria que se encuentra en la piel y fosas nasales de las personas sanas, que causa gran variedad de infecciones, desde infecciones menores de la piel (forúnculos, ampollas, vejigas) y abscesos cutáneos hasta enfermedades que pueden poner en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock toxico (SST) y sepsis. (25)

Es un coco que crece agrupado en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), que responde positivamente a la tinción de Gram, es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10 % de sal común. Por esto puede crecer en el agua del mar. Produce la fermentación láctica. Es catalasa positivo y coagulasa positivo. (25)

1.14.1.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Catalasa	positivos
Producción de ácido a partir de glucosa	Condiciones aeróbicas y anaeróbicas
Manitol	positivo
Fosfatasa	positiva
Coagulasa	positivo
Reducción Nitrito a nitrato(2)	positivo

1.14.1.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE CULTIVO

Staphylococcus aureus crece bien en medios de cultivo no selectivos, como agar sangre, agar chocolate o agar infusión cerebro-corazón. También los medios líquidos utilizados para hemocultivos permiten recuperar fácilmente este microorganismo.

El medio selectivo más empleado en los laboratorios clínicos para aislar *Staphylococcus aureus* es el medio agar sal manitol (medio de Chapman); que por su elevado contenido en sal inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias gramnegativas. Además este medio permite realizar una identificación presuntiva basándose en la coloración amarilla característica que adquieren las colonias, este microorganismo fermenta manitol con producción de ácido. La acidificación produce un cambio en el color del medio que vira de rosa pálido a amarillo. La mayoría de los *staphylococcus* coagulasa negativos no fermentan manitol y crecen en el medio formando colonias de color blanco-rosado.

Otros medios de cultivo selectivos empleados para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* son el agar sangre suplementado con colistina y ácido nalidíxico y el agar feniletanol, que también inhibe el crecimiento de bacterias gramnegativas. (31)

1.14.1.5 PATOGENIA

El *S. aureus* es potencialmente patógeno, las infecciones estafilocócicas específicas son los forúnculos, el impétigo ampollar, la osteomielitis, la enteritis y la intoxicación alimentaria por enterotoxina. Se comprueba que éstos causan infecciones en muchos tejidos, órganos y tractos del cuerpo como: endocarditis, septicemia, meningitis, orzuelos, neumonía, cistitis y sepsis puerperal, etc. *S. aureus* puede producir una variedad de procesos infecciosos que van desde la infección cutáneas relativamente benignas hasta enfermedades sistémicas potencialmente fatales. Las infecciones cutáneas incluyen foliculitis simple y el impétigo (infección superficial de la piel en niños). (11) (25)

En cuanto a infecciones profundas, se pueden desarrollar infecciones más extensas y profundas a partir de infecciones cutáneas, endógenas, o de una exposición a fuentes exógenas. Un recién nacido que es hospitalizado expuesto al estafilococo puede adquirir una neumonía o una septicemia fatal. Los ancianos que han experimentado un ataque de influenza pueden sucumbir a una neumonía estafilocócica. La osteomielitis, una infección del hueso y médula ósea que asume la forma de un absceso resulta difícil de erradicar. (5) (11)

También hay cepas de *S. aureus* que pueden producir intoxicaciones alimentarias debido a la elaboración de exotoxinas durante su desarrollo en alimentos contaminados. Dos a tres horas después de la ingestión de ésta causa un cuadro caracterizado por vómitos violentos, calambres, diarreas y postración, raras veces es fatal, el paciente se recupera en un lapso máximo de 24-48 horas. (11)

La adquisición puede ser exógena o endógena. La transmisión exógena puede llevarse a cabo a través de la contaminación de tejido traumatizado (heridas o quemaduras); a

través de la introducción al tejido de material médico contaminado y la ingestión de alimentos o leche contaminados.

Es un agente de gran relevancia intrahospitalaria, donde ha adquirido resistencia a la Oxacilina. La contaminación intrahospitalaria se lleva a cabo a través de las manos del personal a cargo. (11) (5)

1.14.1.6 FACTORES DE VIRULENCIA

Los factores de virulencia que presenta *S. aureus*, pueden ser productos extracelulares o propios de la célula bacteriana.

1.- Coagulasa. Es una enzima que le da la cualidad de coagular el plasma humano.

Existe una coagulasa libre, que es una proteína secretada con múltiples formas antigénicas, la cual se puede evidenciar en un tubo de ensayo con plasma humano o de conejo, resultando un coágulo de fibrina. Aparte, existe una coagulasa unida a la pared bacteriana que actúa como factor de la agregación plaquetaria.

2.- Hemolisinas. Proteínas, de las cuales alfa y delta son significativas para el hombre.

Alfa es termolábil, pero produce lisis de eritrocitos y toxicidad para otras líneas celulares; bloquea la repolarización de la membrana plasmática, por lo cual genera contracción de la musculatura lisa y vasoconstricción. Lo anterior resulta en la reducción del flujo sanguíneo y en una acidosis láctica. Por lo mismo, existe hipertensión.

3.- Leucocidina. Proteína que ayuda al microorganismo a sobrevivir dentro de los fagosomas leucocitarios.

4.- Hialuronidasa. Enzima que degrada el tejido conectivo, permitiendo el avance del microorganismo hacia zonas más profundas.

5.- Estafiloquinasa. Enzima que disuelve los coágulos de fibrina.

- 6.- Lipasas.** Degradan los ácidos grasos presentes en los tejidos cutáneos sanos.
- 7.- Enterotoxinas.** Proteínas relativamente estables al calor y resistentes a enzimas proteolíticas. Suprimen la actividad de IgM aumentan la susceptibilidad del paciente a generar shock. Enterotoxinas A y D son las más comunes.
- 8.- Toxina exfoliativa.** Genera la separación del tejido intraepidérmico, produciendo el síndrome de la piel escaldada.
- 9.- Proteína A.** En la superficie de la pared bacteriana. Se une a la región Fc de la IgG, inactivándola.
- 10.- Penicilinasa o b-lactamasa.** Hidroliza el anillo b-lactámico presente en la estructura molecular de las penicilinas.
- 11.- Catalasa.** Transforma el peróxido de hidrógeno en agua.
- 12.- Toxina del Shock tóxico (TSST-1).** Causante del síndrome del Shock tóxico. (93)
(31)

1.14.1.7 SUSEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA DE *Staphylococcus aureus*

En la actualidad las cepas más habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, por lo que los antibióticos que muestran una mayor eficacia para combatir al estafilococo son los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina, siendo la rifampicina y la vancomicina los que presentan más efectividad. Este tratamiento antimicrobiano, según sea el caso, deberá acompañarse de la eliminación de las vías de entrada como los catéteres venosos permanentes o los drenajes quirúrgicos.

Como sucede en todos los tratamientos, y en especial tratándose del *Staphylococcus aureus*, es importante finalizar las dosis prescritas aunque previamente se haya

experimentado una clara mejoría. Las dosis incompletas conducen a la resistencia del medicamento por parte del *Staphylococcus aureus*. (57)

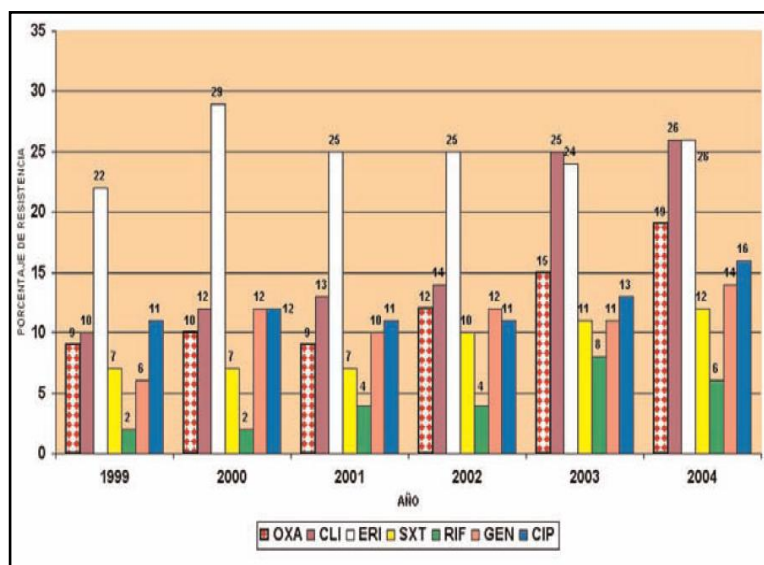
- RESISTENCIA A PENICILINA

La resistencia a penicilina de los *S.aureus* apareció muy rápidamente, dos años después de su introducción clínica en 1944. Esta es debida a la producción de la enzima penicilinas (un tipo de β -lactamasa). Actualmente más del 90% de los *S.aureus* producen esta enzima en muchas regiones geográficas, en el Ecuador la resistencia a penicilina está en el 94%. (72) (57)

- RESISTENCIA A OXACILINA (ORSA)

La oxacilina es una penicilina semisintética estable a la acción de las β -lactamasa, es ampliamente utilizada en América Latina. Un aislamiento resistente a oxacilina es denominado ORSA del inglés Oxacillin Resistant *S. aureus*. Otras penicilinas semisintéticas son la meticilina, nafcilina, cloxacilina y dicloxacilina.

Jeannete Zurita Salinas publicó en la revista Médica Vozandes 2005, un estudio que realizó en una comunidad de Quito a los pacientes que asisten al hospital desde el año 1999-2004. La resistencia de *S. aureus* provenientes de la comunidad se encuentra en el Gráfico No. 1. (41)



FUENTE: REVISTA VOZANDES 2005, JEANNETE ZURITA

GRÁFICO No. 1. RESISTENCIA EN *Staphylococcus aureus* de la comunidad 1999-2004

1.14.1.7.3 RESISTENCIA A VANCOMICINA

Desde 1996 han aparecido los primeros reportes de infecciones causadas por *S. aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina (CIM 8-16 µg/ml) conocidos como VISA del inglés Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*, inicialmente se reportaron en el Japón pero ya han sido aislados en una variedad de países. Esto realmente causó una alarma mundial dada la frecuencia con que el *S. aureus* produce infecciones. En el 2002 la comunidad médica reporta desde Michigan, USA, el primer aislamiento de *S. aureus* totalmente resistente a vancomicina (CIM1024 µg/ml) aislado de un paciente con diálisis. El aislamiento portaba el gen *vanA* que confiere resistencia a vancomicina.

Debido a que solamente un puñado de infecciones, alrededor de 50 infecciones VISA han sido identificadas no existe un análisis de los factores de riesgo. La mayoría de pacientes con infecciones VISA sin embargo, han tenido infecciones previas con ORSA, y han recibido muchos y prolongados esquemas de tratamiento con vancomicina, también son pacientes que están en diálisis peritoneal.

Las cepas con heteroresistencia VISA a menudo parecen ser susceptibles en las evaluaciones del laboratorio. Así, la heteroresistencia puede tener importantes implicaciones en la identificación correcta o efectiva para identificar estas subpoblaciones. La heteroresistencia puede también ayudar a explicar por qué la terapia con vancomicina a veces falla en erradicar una infección causada por una cepa ORSA, la cual aparece como sensible a la vancomicina in vitro.(57) (72)

1.14.2 *Escherichia coli*

1.14.2.1 TAXONOMÍA

Reino	Bacteria
Phillum	Proteobacteria
Clase	Gamma Proteobacteria
Orden	Enterobacteriales

Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>coli</i> (2)

1.14.2.2 DESCRIPCION Y CARACTERISTICAS GENERALES

Son bacilos de 1 a 3 μm por 0.5 μm , sus formas varían desde cocos a pequeños bastoncillos, que se presentan solos, en pares, en cortas cadenas, agrupados, en general móviles por flagelos peritricos, aunque existen variantes móviles no flageladas. No forman esporas; generalmente son no capsulados y Gram negativos. (15) (18)

La temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* toleran temperaturas hasta de 42 °C. De acuerdo con sus requerimientos de oxígeno son aeróbicas o anaeróbicas facultativas. Los requerimientos de nutrientes en el metabolismo de los miembros de esta familia no son altamente exigentes y crecen de manera muy similar, cualquiera de sus especies, en la mayoría de los medios que se utilizan, por lo general, en el laboratorio de microbiología clínica diagnóstica, desde un agar nutriente, agar-sangre, agar-sangre-chocolate o caldo nutritivo. (24)

En cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente y en los cultivos viejos se presentan formas de una dimensión mayor. Produce dos tipos de fibra que rigen su capacidad patógena. Produce un tipo de enzima denominada bacteriocina que se sabe regula la flora normal según el principio de la antibiosis. (23)

1.14.2.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Glucosa	Positivo
Gas/ glucosa	Positivo
Lactosa	Positivo
SH ₂	Negativo
Citrato	Negativo

Fenilalanina desaminasa	Negativo
Indol	Positivo
Lisina descarboxilasa	Positivo
Manitol	Positivo
Movilidad	Positivo
Ureasa	Negativo

(2)

1.14.2.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE CULTIVO

Las colonias de esta bacteria varían según el medio de cultivo donde crezcan, en el caso el medio de cultivo es Agar Eosina Azul de Metileno abreviado EMB, las colonias tienen en demasía una coloración verde-metálico, lo cual es característico de *E. coli*, aunque hay otras bacterias que logran producir este color es muy tenue y escaso. Se logran ver colonias aisladas, son colonias medianas, circulares, convexas, moradas, contorno verde-metálico, bordes redondeados.

(23) (52)

1.14.2.5 PATOGENICIDAD

E. coli es la especie bacteriana más comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran virtualmente todos los tejidos humanos y sistemas de órganos. *E. coli* es uno de los organismos comunes involucrados en sepsis Gram negativa y shock inducido por endotoxinas. Las infecciones del tracto urinario y de las heridas, la neumonía en pacientes hospitalizados inmunosuprimidos y las meningitis en los neonatos son otras formas comunes de infección causada por *E. coli*. (11)

Las infecciones por *E. coli* pueden ser divididas en extraintestinales e intestinales. Las extraintestinales pueden ocurrir por el contacto de persona a persona. *E. coli* es una causa común de infecciones urinarias como: cistitis, pielitis, pielonefritis, esto ocurre por la íntima asociación entre el hábitat normal de los microorganismos y el tracto urinario,

estas infecciones están alrededor del 20% de todas las infecciones urinarias en Hospitales. En pacientes tratados. (23)

Las infecciones intestinales están limitadas a las producidas por las seis clases de *E. coli* que en la actualidad se consideran como patógenas entéricas, estas son:

E. coli enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* difusamente adherente (ECDA). (23)

TABLA N°1. CLASES DE *Escherichia coli* CONSIDERADAS COMO PATÓGENAS ENTÉRICAS, CON SU FENOTIPO Y PATOLOGÍA (11)

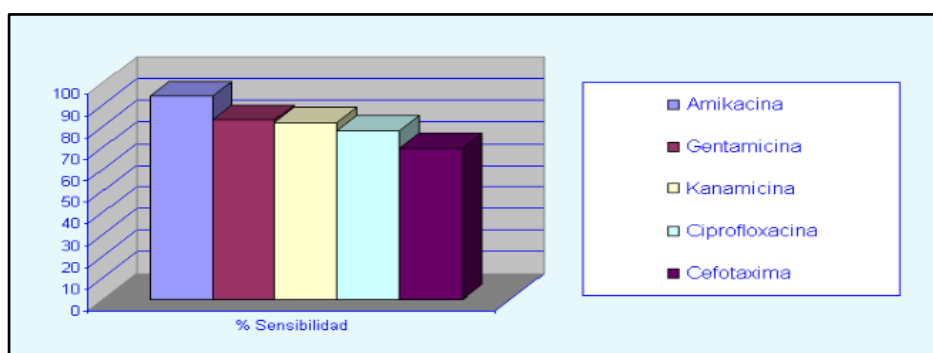
TÉRMINO	FENOTIPO PATÓGENO	PATOLOGÍA
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Elaboración de toxinas secretorias que no dañan el epitelio mucoso	“Diarrea del viajero”. El síntoma predominante es una diarrea acuosa profunda, a menudo acompañada de contracciones abdominales leves. En algunos casos ocurren deshidratación y vómitos
<i>E. coli</i> enteropatógena	Se adhieren a las células epiteliales en microcolonias localizadas y causan lesiones de adhesión y borrado.	Usualmente ocurre en infantes. Se caracteriza por fiebre de bajo grado, malestar, vómitos y diarrea, con una cantidad prominente de moco, pero sin mucha sangre.
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	Invaden células epiteliales	Disentería: las características sobresalientes son fiebre y colitis. Síntomas de tenesmo, sangre y moco y muchos leucocitos en materia fecal.
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	Elaboración de citotoxinas (SLT)	Diarrea sanguinolenta con leucocitos. A menudo sin fiebre. Es común el dolor abdominal.
<i>E. coli</i> enteroagregativa	Se adhieren a células epiteliales en un patrón que hace recordar una pila de ladrillos	Diarrea acuosa, vómitos, deshidratación y con menor frecuencia dolor abdominal.
<i>E. coli</i> difusamente adherente	Se ha descrito una fimbria superficial que media el fenotipo de adhesión difusa designada como F 1845 y que está mediada por genes que pueden ser cromosomales o estar portados por un plásmido.	Diarrea en niños de 1-5 años. Heces líquidas sin sangre ni leucocitos.

1.14.2.6 SUSEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA DE *Escherichia coli*

2.14.2.6.1 SUSEPTIBILIDAD

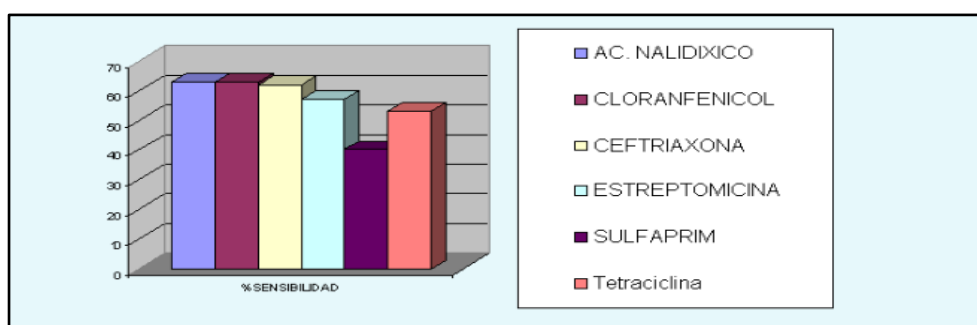
El tratamiento apropiado depende de la enfermedad y debe ser guiado por análisis de laboratorio de las sensibilidades a antibióticos de la cepa infectante de *E. coli*. Como organismos Gram-negativos, son resistentes a muchos antibióticos que son eficaces contra organismos Gram-positivos. Los antibióticos que se pueden usar para tratar la infección por *E. coli* incluyen (pero no están limitados a) amoxicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina, nitrofurantoína. No todos los antibióticos son adecuados para todas las enfermedades causadas por *E. coli*, y el consejo de un médico debe ser buscado. La resistencia a los antibióticos es un problema creciente. Algo de esto es debido al uso excesivo de antibióticos en humanos, pero parte de él es probablemente debido a la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento en animales de consumo. (15) (24)

Se describieron y evaluaron la sensibilidad antimicrobiana en 109 cepas de *Escherichia coli* identificada en pacientes con infección urinaria alta. Los métodos empleados para el aislamiento del microorganismo y la susceptibilidad antimicrobiana fueron los recomendados por las Normas Cubanas de Microbiología. La susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *Escherichia coli* estudiada fue Amikacina 94 %, Gentamicina 83%, Kanamicina 82%, Ciprofloxacina 82 %, Ácido Nalidíxico 63 %, Cloranfenicol 63 %, Cetriaxona 62 %, Estreptomicina 57 %, Tetraciclina 53 %, Sulfaprin 40 %. La sensibilidad de la bacteria a la Amikacina demuestra la utilidad de este antibiótico en el tratamiento de las infecciones urinarias severas. Dentro de los antibióticos más efectivos para el tratamiento ambulatorio se encontró la ciprofloxacina y se demostró la baja efectividad que tiene el Sulfaprim en el tratamiento de la sepsis urinaria alta.(34)



FUENTE: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202006/vol5%202006/tema01.htm>

GRÁFICO No. 2. ANTIBIOTICOS CON MAYOR % DE SENCIBILIDAD A LAS CEPAS *E. coli*



FUENTE: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202006/vol5%202006/tema01.htm>(34)

GRÁFICO No. 3. ANTIBIOTICOS CON MEDIANA SENCIBILIDAD A LAS CEPAS *E. coli*

1.14.2.6.2 RESISTENCIA

Se realizó un estudio por Lorena Santana en la Facultad de Medicina de la ESPOCH en el 2009 para determinar el perfil de resistencia bacteriana de las infecciones urinarias de las pacientes embarazadas atendidas en el Servicio de Gineco Obstetricia del Hospital Provincial General Docente Riobamba durante el periodo enero – diciembre 2008. Para la investigación se procedió a la recolección de datos obtenidos de los archivos estadísticos de hospital, de donde se identificaron 140 historias clínicas de pacientes con dicha patología representando el 100%, de las cuales 33 pacientes tuvieron urocultivos positivos es decir el 34% , por lo tanto específicamente se trabajó con esta muestra. El cuadro clínico estuvo dado principalmente por disuria (55%), polaquiuria (67%), fiebre (58%), dolor pélvico (42%), escalofrío (15%). Según los urocultivos se identificaron dos gérmenes principales *E. coli* (73%), *Proteus* (27%). El porcentaje de resistencia bacteriana se dio principalmente a Ampicilina (73%), fosfomicina (48%), amoxicilina + ácido clavulánico (39%), el mayor porcentaje de sensibilidad estuvo dado por amikacina

(79%), cefalexina (55%), gentamicina (24%). La patología se presenta con mayor frecuencia en edades comprendidas entre 21 y 26 años (52%), con predominio en el tercer trimestre de embarazo (36%). Por lo tanto se concluyo que el patrón de resistencia bacteriana está dado principalmente a la ampicilina, fosfomicina, amoxicilina + ácido clavulánico por lo que en el manejo terapéutico no debería considerárselas como de primera elección. (51)

1.14.3 *Salmonella gallinarum*

1.14.3.1 TAXONOMÍA

Reino	Bacteria
Phillum	Proteobacteria
Clase	Gamma Proteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Salmonella</i>
Especie	<i>gallinarum, pollorum</i> (91)

1.14.3.2 DESCRIPCIÓN Y CARACTERISTICAS GENERALES

Es un bacilo corto y grueso sin flagelos no forma esporas ni cápsulas, se tiñe con colorantes ordinarios es Gram negativo puede aislarse fácilmente de la sangre e hígado. Es aerobio y anaerobio facultativo y su temperatura óptima para el crecimiento es los 37°C. Posee un antígeno O 1,9 y 12 similar al grupo D de la clasificación de las Salmonellas. (91)

1.14.3.3 PATOGENIA

La enfermedad se difunde a través de la ingestión de alimento y agua contaminada con las excreciones de aves clínicamente afectadas o portadores y por vía transovarica. La enfermedad tiene una presentación aguda en pollitos durante los primeros días de vida. En las gallinas adultas, el germen produce una infección crónica causando un mayor

efecto en los ovarios por deformidad de estos, en el caso de los pavos la enfermedad ataca del mismo modo que en las gallinas adultas. (91)(92)

1.14.3.3.1 SIGNOS CLÍNICOS

Los principales signos clínicos, son muertes repentinas sin presentación de signología en otros casos se puede presentar diarrea blanca, disminución del apetito, palidez de la cabeza, cresta y barbillas, el período de incubación de esta enfermedad es de 4 a 6 días presentando una mortalidad variable. Las aves pueden presentar polidipsia, respiración acelerada, en casos agudos esta mortalidad puede incrementarse al 100%.

A la necropsia se pueden observar aumento de volumen y congestión del hígado y bazo, los pulmones edematosos y de un color pardo, después de un corto periodo de exposición al aire la superficie del hígado se muestra con un resplandor verde brillante. En aves de postura el ovario frecuentemente muestra una marcada degeneración, la ruptura de óvulos puede observarse mediante yema en la cavidad abdominal de las aves muertas. (91)

1.14.3.4 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Salmonella gallinarum

Glucosa	Positivo
Gas/ glucosa	Positivo
Lactosa	Negativo
SH ₂	Positivo
Citrato	Positivo
Fenilalanina desaminasa	Negativo
Indol	Negativo
Lisina descarboxilasa	Positivo
Manitol	Positivo

Movilidad	Positivo
Ureasa	Negativo

(2)

1.14.3.5 CARACTERISTICAS GENERALES DE CULTIVO

Los medios para el aislamiento y serotificación de las Salmonelosis son:

Medios Selectivos de enriquecimiento

- Medios de cultivo
- Medios para bioquímica complementaria

El resultado positivo o negativo se dará 48 a 72 horas de haber sembrado los medios.

(92)

1.14.3.6 SUSEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA DE *Salmonella gallinarum*

En el 2010, se publicó en la Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia una investigación cuyo objetivo fue determinar la respuesta de 20 cepas de *Salmonellas grupo D* (móviles e inmóviles) aisladas de aves ponedoras comerciales en Colombia frente a diferentes antimicrobianos. Para su aislamiento y tipificación se utilizaron técnicas microbiológicas convencionales, pruebas bioquímicas, serológicas y pruebas de susceptibilidad a los antibióticos por difusión en agar. Los resultados revelaron una resistencia total hacia la estreptomicina, seguida de altas resistencias para tetraciclina y florfenicol, y una menor resistencia a productos como fosfomicina y cloramfenicol. (91)

De acuerdo con los datos se pudo observar un comportamiento de resistencia muy variado que va desde el 0% para productos combinados como fosfomicina más tilosina y trimetoprim sulfa, hasta el 95% y 100% para productos de uso común, como estreptomicina y tetraciclinas. Los porcentajes de sensibilidad que presentaron los productos combinados se pueden deber a que aún se registra poco uso de éstos. Por el contrario, los elevados niveles de resistencia que se evidenciaron para otros

medicamentos podrían explicarse por el continuo uso de los mismos, lo que genera una presión de selección sobre las cepas de *Salmonellas* grupo D aisladas. (91) (92)

El cloramfenicol ha sido prohibido por la OIE en animales de abasto. Por tal motivo, se esperaría un porcentaje de sensibilidad del 100%, pero el valor obtenido fue de 85%, por tal motivo es recomendable tomar medidas estrictas de control para el uso de estos productos. (91)

Comparando cepas móviles con inmóviles se pudo observar que ambas obtuvieron una respuesta similar para tetraciclina y estreptomicina, con un porcentaje de resistencia por encima del 90%, esto puede deberse al continuo uso de estos medicamentos para tratar dos tipos de enfermedades en aves (pulorosis y tifoidea aviar, producidas por las cepas inmóviles y enfermedades paratifoideas producidas por cepas móviles).

Tanto *Salmonella pullorum* como *Salmonella gallinarum* mostraron resistencia similar a estreptomicina y tetracinas; por el contrario, frente a amikacina, la biovariedad *gallinarum* fue más sensible, por tal motivo sería necesario realizar un estudio en donde se evalúe un número mayor de cepas de *Salmonella pullorum*, con el fin de poder determinar con mayor precisión su comportamiento frente a estos antimicrobianos. El género *Salmonella* son microorganismos que se puede transmitir directamente de la gallina, ya sea por su presencia en los folículos ováricos o por contaminación en la cáscara mediante materia fecal. Es importante resaltar que la presencia de esta bacteria altera la calidad e inocuidad del huevo, no solo por contaminación directa, sino por los residuos de antimicrobianos utilizados indiscriminadamente. (39)

TABLA No. 2 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA (DIFUSIÓN EN AGAR) DE 11 CEPAS DE *Salmonella gallinarum* Y DOS DE *Salmonella pullorum*

Antimicrobiano	<i>Salmonella gallinarum</i>						<i>Salmonella pullorum</i>					
	Resistencia N° cepas	%	S	M	%	Sensibilidad N° cepas	%	Resistencia N° cepas	%	SM	%	Sensibilidad N° cepas
Amikacina	3	27,3	3	27,3	5	45,5	2	100	0	0,0	0	0
Amoxicilina	6	54,5	3	27,3	2	18,2	0	0,0	2	100	0	0
Ampicilina	1	9,1	7	63,6	3	27,3	1	50	0	0,0	1	1
Cefalexina	4	36,4	0	0,0	7	63,6	0	0,0	0	0,0	2	2
Ciprofloxacina	1	9,1	6	54,5	4	36,4	1	50	1	50	0	0
Cloramfenicol	0	0,0	1	9,1	10	90,9	0	0,0	0	0,0	2	2
Doxiciclina	5	45,5	3	27,3	3	27,3	0	0,0	2	100	0	0
Enrofloxacina	3	27,3	4	36,4	4	36,4	0	0,0	2	100	0	0
Estreptomicina	11	100	0	0,0	0	0,0	2	100	0	0,0	0	0
Florfenicol	8	72,7	1	9,1	2	18,2	2	100	0	0,0	0	0
Fosfomicina	1	9,1	4	36,4	6	54,5	0	0,0	1	50	1	1
Fosfomicina	0	0,0	0	0,0	11	100	1	50	0	0,0	1	1
más fructosa 1,6 difosfato												
Fosfomicina	0	0,0	0	0,0	11	100	0	0,0	0	0,0	2	2
más fructosa 1,6 difosfato y Tilosina												
Gentamicina	2	18,2	5	45,5	4	36,4	0	0,0	0	0,0	2	2
Kanamicina	3	27,3	3	27,3	5	45,5		0,0	1	50	1	1
Norfloxacina	1	9,1	9	81,8	1	9,1	2	100	0	0,0	0	0
Tetraciclina	10	90,9	1	9,1	0	0,0	2	100	0	0,0	0	0
Trimetoprim sulfa	0	0,0	2	18,2	9	81,8	0	0,0	0	0,0	2	2
SM: sensibilidad media												

FUENTE: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remez/article/view/18252/19836> (39)

1.14.4 *Klebsiella pneumoniae*

1.14.4.1 TAXONOMIA

Dominio	Bacteria
Phillum	Proteobacteria
Clase	Gamma Proteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>Pneumoniae</i> (2)

1.14.4.2 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

Es una bacteria aerobia Gram-negativa de forma de bastoncillo, la más importante del género *Klebsiella* de Enterobacteriaceae. Fue descubierta por Carl Friedlander y ocasionalmente es llamada bacilo de Friedlander. El diagnóstico comienza a partir de la clínica; en los casos de neumonía, es especialmente útil el estudio radiográfico. El diagnóstico definitivo se lo obtiene a partir del cultivo de muestras obtenidas de las mucosas del tracto respiratorio superior.(44)

1.14.4.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Glucosa	Positivo
Gas/ glucosa	Positivo
Lactosa	Positivo
SH ₂	Negativo
Citrato	Negativo
Fenilalanina desaminasa	Negativo
Indol	Negativo
Lisina descarboxilasa	Positivo
Manitol	Positivo
Movilidad	Negativo
Ureasa	Positivo(2)

1.14.4.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE CULTIVO DE *Klebsiella pneumoniae*

Colonias grandes planoconvexas, mucoides, brillantes, forma irregular, también se observan redondeadas, bordes ondulados, lactosa positivo (consume el carbohidrato lactosa lo cual acidifica el medio y el indicador rojo de fenol cambia rojo-rosado, por ello las colonias se ven de ese color) (44)

1.14.4.5 PATOGENICIDAD

Dentro de este género bacteriano, está implicada principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, y pacientes con EPOC, diabetes mellitus o alcohólicos. Causa alrededor del 1% de las neumonías bacterianas y puede causar condensación hemorrágica extensa del pulmón. Además, en ocasiones provoca infección del aparato urinario y bacteriemia a partir de lesiones focales en pacientes debilitados que puede terminar con la vida del paciente. Algunas de las complicaciones más frecuentes son el absceso pulmonar y el empiema. (46)

1.14.4.6 TRATAMIENTO

No se recomienda el uso de penicilinas, cefalosporinas (todas las generaciones), monobactames y carbapenemes independientemente de la sensibilidad in vitro. Opciones de tratamiento (requieren demostrar sensibilidad): agentes no beta-lactámicos. (Según: SERVICIO ANTIMICROBIANOS - INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS (INEI) Buenos Aires, Argentina). (46)

1.14.4.7 SUSEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA DE *Klebsiella pneumoniae*

En el Tabla N°3 se muestran los resultados de susceptibilidad obtenidos. Los mayores porcentajes de resistencia fueron encontrados en el grupo de las cefalosporinas (47,5 %), con excepción de la cefoxitina, indicador importante de presencia de betalactamasas de espectro extendido. En orden decreciente se encontraron las fluoroquinolonas (41 %) y los betalactámicos/inhibidores con valores que oscilaron entre 13,1 y 42,6 %. Sin embargo, antimicrobianos como la piperazilina/tazobactam, amikacina, gentamicina y meropenem fueron los que mostraron mejores porcentajes de sensibilidad. (65)

TABLA No. 3 SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA (%) EN CEPAS DE *K. pneumoniae*

Antimicrobianos	Resistente (%)	Intermedio (%)	Sensible (%)
Amoxicilina/clavulánico	13,1	27,9	59
Ampicilina/sulbactam	42,6	4,9	52,5
Piperazilina/tazobactam	36,1	1,6	62,3
Cefuroxima	47,5	0	52,5
Cefoxitina	1,6	0	98,4
Cefixima	47,5	0	52,5
Ceftriaxona	47,5	0	52,5
Cefepime	47,5	0	52,5
Meropenen	6,6	0	93,4
Amikacina	11,5	26,2	62,3
Gentamicina	39,3	0	60,7
Ciprofloxacina	41	0	59

FUENTE: http://bvs.sld.cu/revistas/med/vol51_3_12/med04312.htm (65)

1.14.5 *Candida albicans*

1.14.5.1 TAXONOMÍA

Reino Fungi
 Filo Deuteromiceta
 Subfilo Saccharomycotina
 Clase Saccharomycetes
 Orden Saccharomycetales
 Familia Saccharomycetaceae
 Género *Candida*
 Especie *Albicans* (2)

1.14.5.2 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

C. albicans es una levadura, cuyas células en yema son redondas, ovaladas u oblongas de 2.5 por 3-14 µm y de paredes delgadas, se presentan solas o en racimos, presentan coloración azul al Gram. (5)

Forma clamidosporas de pared gruesa sostenidas aisladamente o en racimos, habitualmente en los ápices de pseudohifas y blastoconidias producidas en densos

racimos regularmente espaciados a lo largo de las pseudohifas. Es un hongo dimorfo capaz de producir hifas y micelios verdaderos, a menudo forma pseudomicelios compuestos de pseudohifas. Las paredes celulares de *C. albicans* contiene los constituyentes micóticos típicos y además compuestos no identificados que son tóxicos. (2)

1.14.5.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Maltosa	positivo
Sacarosa	positivo
Trehalosa	positivo
Galactosa	Positivo
Celobiosa	Negativo
Xilosa	Positivo
Rafinosa	Negativo
Lactosa	Negativo
Dulcitol	Negativo
Melibiosa	Negativo
Ureasa	Negativo
NO ₃ - NO ₂	Negativo
Pseudohifas	Positivo(5)

1.14.5.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE CULTIVO DE *Candida albicans*

Candida albicans a temperatura ambiente existe como levadura, pero cuando se inocula dentro de un huésped susceptible o cuando son cultivadas con bajos potenciales de óxido-reducción forman filamentos denominados pseudomicelios. En cultivo se trata de una colonia de crecimiento rápido (2-5 días) y de crecimiento lento (2-3 semanas). (24) *C. albicans* crece rápidamente en agar Sabouraud, agar sangre, soya tripticasa y en otros medios enriquecidos. (24)

En agar glucosado de Sabouraud germina bien y produce colonias que recuerdan las bacterianas; son irregulares, cremosas, húmedas, opacas y al envejecer desarrollan hifas al interior del agar. Son capaces de desarrollarse a 37°C o a temperatura ambiente. El crecimiento es aerobio, diminutas colonias suelen ser visibles a las 24-36 horas y alcanza un tamaño de 1.5 a 2 mm en aproximadamente una semana en agar Sabouraud.

Las colonias por lo general son de color blanco pero pueden tornarse cremas o bronce al envejecer. (5) (28)

En el cultivo de Sabouraud podemos ver colonias blancas, blandas, cremosas, con olor a levadura. A la observación de las mismas en el microscopio hallamos blastoconidias en la superficie y en la profundidad, el pseudomicelio compuesto de pseudohifas; en las uniones de estas últimas se ven blastoconidias agrupadas en racimos, y a veces hay clamidosporas en los extremos. (5) (24)

1.14.5.5 PATOGENICIDAD

C. albicans es un agente colonizador habitual de la piel y mucosas humanas. En promedio, el 25-30% de los individuos son portadores de *C. albicans* en la cavidad oral, con mayor incidencia en los lactantes, niños pequeños y personas con SIDA. La mala higiene bucal y las dentaduras postizas aumentan la tasa de portación oral. Alrededor del 50% de las personas poseen *C. albicans* en su tracto gastrointestinal y alrededor del 30% de las mujeres tienen colonización vaginal en algún momento. La portación vaginal es particularmente prevalente durante el embarazo. (21)

La candidiasis es la más frecuente de las micosis sistémicas, causa alrededor del 25% de todas las muertes dependientes de hongos. La candidiasis es una infección aguda o subaguda provocada por *C. albicans*, éste hongo puede ser aislado de heces, vagina, garganta, uñas, bronquios y los pulmones de pacientes en quienes los mecanismos de defensa normales se hallan alterados por otra enfermedad, por ejemplo por el empleo excesivo de antibióticos o agentes inmunosupresores. También existen reportes de ciertas

infecciones de la sangre como, endocarditis (en drogadictos) y meningitis ocasionada por *Candida*. (21)

1.14.5.6 SUSEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA DE *Candida albicans*

Se recolectaron 62 muestras biológicas con candidosis-pectoración (11), orina (7), sangre (7), mucosa oral (5), exudado faríngeo (4), uñas (4), pústulas cutáneas (3), pliegue sub-mamario (2), secreción ótica (2), úlcera palatina (2), mucosa nasal (1) y vulva (1). De estas muestras se correspondieron a *C. albicans*, 18.8% a *C. parapsilosis*, 7.8% a *C. krusei*, 4.7% a *C. glabrata*, 3.1% a *C. dubliniensis* y 1.6% a *C. tropicalis*. Los resultados de sensibilidad y resistencia de cada especie están en el Tabla No 4. (66)

Tabla No. 4 RESPUESTA DE SENSIBILIDAD DOSIS-DEPENDIENTE DE LOS AISLADOS CLÍNICOS DE *Candida sp.*

	Antifúngico	[µg/mL]	Cepas sensibles (S)		Cepas resistentes (R)		Cepas intermedias (SDD)	
			Cantidad	%	Cantidad	%	Cantidad	%
<i>Candida albicans</i>	5FC	2	40	97.6	1	2.4	0	0.0
		32	40	97.6	1	2.4	0	0.0
	AB	2	40	97.6	0	0.0	1	2.4
		8	41	100	0	0.0	0	0.0
	MCZ	0.5	29	70.7	6	14.6	6	14.6
		8	37	90.2	1	2.4	3	7.3
	KET	0.5	31	75.6	4	9.8	6	14.6
		4	33	80.5	3	7.3	5	12.2
	ITR	0.5	30	73.2	5	12.2	6	14.6
		4	32	78.0	4	9.8	5	12.2
	FLU	8	33	80.5	2	4.9	6	14.6
		64	31	75.6	2	4.9	8	19.5

FUENTE: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd2012/rmd122b.pdf> (66)

1.14.6 *Pseudomonas aeruginosa*

1.14.6.1 TAXONOMÍA

Reino Bacteria
 Filo Proteobacteria
 Clase Gamma Proteobacteria
 Orden Pseudomonadales
 Familia Pseudomonadaceae
 Género *Pseudomonas*

Especie *Aeruginosa*(5)

1.14.6.2 DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

Etimológicamente, *Pseudomonas* significa falsa unidad, del griego *pseudo*, que significa falso, y *monas*, que significa unidad simple. El nombre fue usado inicialmente en la historia de la microbiología como sinónimo de gérmenes, *aeruginosa* es el nombre latino para el cardenillo u óxido de cobre. Esto describe el pigmento azul verdoso bacteriano, visto en los cultivos de laboratorio de *P. aeruginosa*. (21)

Son bacilos Gram negativos pequeños bastoncillos delgados de 1.5 mm y 3 mm. Están unidos en pares y en cadenas cortas, posee un flagelo polar. Crece 30° a 37°, aerobio estricto y su fuente de energía: Oxidación de azúcares, no fermentadores, (no fermentan la glucosa), son oxidasa-positivos (la oxidación comprende del Transporte por citocromo “C”), es aeróbico pero facultativamente anaeróbico y la mayoría de las especies producen pigmentos:

Piocianina	azul-oscuro
	Pigmentos Fluorescentes Luz UV
Pioverdinas	amarillo-verdoso o amarillo parduzco
Piomelanina	marrón-negro (21)

1.14.6.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Piocianina	positivo
Pioverdina	positivo
Desarrollo o crecimiento a 42°C	positivo
O-F glucosa	Oxidativo o inerte
oxidasa	positivo
Movilidad	positivo
Arginina dehidrolasa	positivo
Hidrólisis de la gelatina	positivo

Ureasa	V
Reducción de nitrato (NO ₃)	positivo
Gluconato	positivo
Manitol	V
Indol	negativo
Citrato	positivo
catalasa	positiva
Kanamicina	R
Carbenicilina	S

V (11-89%): de las cepas positivas. (2) (44)

1.14.6.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE CULTIVO de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa requiere un medio aeróbico para su crecimiento óptimo. En caldo simple se desarrolla en exceso, forma una fuerte turbiedad, anillo y película, forma un denso agrado que parece polvo de tiza fácilmente desintegrable, es característico un olor intenso debido a la trimetil-amina, el medio se torna de color verdeazulado. (11)

En agar simple, las colonias son grandes redondas, brillantes, de borde continuo u ondulado, grisáceas con el centro opaco y periferia traslucida, pH 6.8 a 7.2, la colonia no toma color por el pigmento elaborado, este se difunde al medio proporcionándole una tonalidad verdosa fluorescente en los primeros días, que posteriormente se vuelve parda. (11) (5)

1.14.6.5 PATOGENICIDAD

Este patógeno es oportunista de individuos inmunocomprometidos, *P. aeruginosa* infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas, y también causa otras infecciones de sangre. *Pseudomonas* puede causar neumonías a grupos, necesitando a veces ayuda mecánica para superar dichas neumonías, siendo uno de los más comunes agentes aislados en muchos estudios. La piocianina es un factor de virulencia de la bacteria. Sin

embargo, la investigación indica que el ácido salicílico puede inhibir la producción de piocianina. Uno en diez hospitales se infecta con *Pseudomonas*. La fibrosis quística está también predispuesta a la infección con *P. aeruginosa* de los pulmones. *P. aeruginosa* es el causante de dermatitis, causada por disminución del control de la calidad del agua de bebida. El más común causante de altas fiebres en infecciones es *P. aeruginosa*. También ha estado involucrado en foliculitis de tinas de agua caliente, en especial aquellas sin un control higiénico continuo. (11)(44)

En el hombre es el agente causal de una serie de tipos clínicos conocidos como piocianosis. Causa conjuntivitis virulenta en recién nacidos, lesiones ulcerativas de la cornea, meningitis, endocarditis y septicemia son afecciones de curso mortal. (5)

La exudación de pus azulado, con olor a uvas producido por la piocianina, es característica de *P. aeruginosa* también produce infecciones del tracto urinario y del tracto respiratorio inferior; éstas últimas pueden ser graves e incluso amenazantes para la vida de huéspedes inmunocomprometidos. El m.o también produce infecciones oculares devastadoras. La queratitis por *Pseudomonas*, la infección de úlceras de la córnea y la endoftalmitis deben encararse como una emergencia médica que puede ser fulminante y que amenaza con la pérdida permanente de la visión. Con regular frecuencia aparecen en bibliografía casos aislados de endocarditis, meningitis, abscesos cerebrales e infecciones óseas por diseminación hemática. La mayoría de los casos de endocarditis requiere un replazo valvular debido a que la infección es difícil de erradicar. (11)

1.14.6.6 SUSEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa*

De un total de 144 cepas de *P. aeruginosa* estudiadas, 90 (62.2%) fueron aisladas de muestras de orina y 54 (37.8%) de vías respiratorias. No hubo diferencias de infección según la procedencia del aislamiento ($p > 0.05$).

Los porcentajes de resistencia a los antibióticos de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* recuperados de los pacientes hospitalizados fueron los siguientes: para los β -lactámicos se registró una elevada resistencia a ceftazidima (71%), cefepima (53%), aztreonam

(62%) y el carbapenem imipenem (47%). El carbapenémico meropenem que presenta propiedades antibióticas incrementadas respecto al imipenem presentó la mayor sensibilidad (73%). Para los aminoglucósidos, amikacina (52%) y gentamicina (55%), lo mismo que para la quinolona ciprofloxacina (57%), se obtuvieron también porcentajes elevados de resistencia (Tabla No 5) (90)

TABLA NO. 5 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN 144 AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiótico	*R n (%)	**I n (%)	***S n (%)
Ceftazidima	102 (71)	7 (5)	35 (24)
Cefepime	76 (53)	20 (14)	48 (33)
Aztreonam	89 (62)	26 (18)	29 (20)
Imipenem	68 (47)	3 (2)	73 (51)
Meropenem	48 (27)	9 (6)	87 (67)
Amikacina	75 (52)	3 (2)	66 (46)
Gentamicina	79 (55)	13 (9)	2 (36)
Ciprofloxacina	82 (57)	14 (10)	48 (33)

*R=Resistente, **I=Intermedio, ***S=Sensible

FUENTE: <http://es.scribd.com/doc/14229371/Resistencia-a-los-antibioticos-en-aislados-clinicos-de-Pseudomonas-aeruginosa-en-un-hospital-universitario-en-Lima-Peru-Rev-Biomed> (90)

1.15 MÉTODOS DE DETERMINACIÓN ANTIMICROBIANA

Podemos distinguir diferentes tipos de métodos en función de la técnica utilizada y de la información que dan (Tabla No. 6).

TABLA NO. 6 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ANTIBIOSENSIBILIDAD

MÉTODO	TÉCNICA	INFORMACIÓN
CUALITATIVO	ANTIBIOGRAMA DIFUSION de MICRODISCOS (KIRBY-BAUER)	RESISTENCIA VALOR INTERMEDIO SENSIBILIDAD
SEMICUANTITATIVO	GRADIENTE ANTIBIOTICO (E-TEST)	APROXIMACION A LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI)
CUANTITATIVO	1. DILUCION DE CALDO: -MACRODILUCION EN TUBO -MICRODILUCION EN PLACA 2. DILUCION EN AGAR 3. SISTEMAS AUTOMATIZADOS (Vitek...)	DETERMINACION DE LA CMI

FUENTE: <http://minnie.uab.es/~veteri/21273/Practica%202.2009-10.pdf> (89)

Cada sistema tiene sus ventajas y sus inconvenientes:

El método de Kirby-Bauer es probablemente el más utilizado por su sencillez y, si se realiza correctamente, presenta una correlación muy buena con los métodos cuantitativos.

Algunos laboratorios trabajan con métodos semicuantitativos como el E-test. Estos sistemas son una modificación del método de Kirby-Bauer, en los que en lugar de discos se utilizan tiras de papel impregnadas con un gradiente del antibiótico, lo que permite una semi-cuantificación. Los sistemas cuantitativos son los más exactos pero también los más laboriosos. (89)

1.15.1 MÉTODO CUALITATIVO

1.15.1.1 ANTIBIOGRAMA DIFUSIÓN DE MICRODISCOS (KIRBY-BAUER)

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. (30)

Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros

métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (ej.: método de dilución). Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores.

Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición. Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS.(30)

1.15.1.1.1 INDICACIONES Y LIMITACIONES

El antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso y no puede predecirse su sensibilidad, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales.

Estas pruebas de sensibilidad también son útiles en estudios epidemiológicos ya que el resultado del antibiograma puede ser considerado como el primer marcador epidemiológico de que se dispone. El método de disco-placa es fácil de realizar, rápido y barato. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp. Y *Enterococcus* spp. Además, con ligeras modificaciones, puede ser aplicado a *Haemophilus* spp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus* spp. (88)

1.15.2 MÉTODO SEMICUANTITATIVO

1.15.2.1 GRADIENDE ANTIBIOTICO E-TEST

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test podemos, mediante lectura directa, determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI). Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente 15 diluciones.

El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición interacciona con la tira. (35)(46)

1.15.3 MÉTODOS CUANTITATIVOS

1.15.3.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

La difusión en disco hace referencia a la difusión que experimenta un agente antimicrobiano a una determinada concentración a partir de discos, tiras o tabletas, que se depositan en un medio de cultivo sólido que ha sido sembrado con el aislamiento del inóculo seleccionado en cultivo aséptico. El método de difusión en disco se basa en la determinación de una zona de inhibición del crecimiento que es proporcional a la sensibilidad de la bacteria frente al antimicrobiano presente en el disco. La difusión de un antimicrobiano en un medio de cultivo inoculado crea un gradiente de la sustancia antimicrobiana. Cuando su concentración llega a ser tan diluida que no logra inhibir el crecimiento de la bacteria ensayada, termina la zona de inhibición. El diámetro de esta

zona de inhibición alrededor del disco antimicrobiano se corresponde con la concentración mínima inhibitoria (MIC) para esa combinación concreta de bacteria y antimicrobiano. En otras palabras, la zona de inhibición se correlaciona de modo inversamente proporcional con el valor de la MIC para la bacteria ensayada. En general, cuanto mayor es la zona de inhibición, menor es la concentración del antimicrobiano que se requiere para inhibir el crecimiento de los microorganismos. No obstante, esto depende también de la concentración del antibiótico en el disco y de su capacidad de difusión. Hay que advertir que las pruebas de difusión en disco basadas solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición, sin considerar su tamaño, no son aceptables como ensayos para la sensibilidad a los antimicrobianos desde el punto de vista metodológico. (88)

1.15.3.1.1 CONSIDERACIONES SOBRE EL USO DE LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN DISCO

La difusión en disco es fácil de realizar, reproducible, y no requiere disponer de una infraestructura cara.

Sus principales ventajas son:

- a) Bajo coste
- b) Facilidad para modificar los discos con los antimicrobianos de prueba cuando así se requiera.
- c) Se puede utilizar como una prueba de detección frente a gran número de aislamientos.
- d) Se puede identificar a un subconjunto de aislamientos para pruebas posteriores por otros métodos, como la determinación de las MIC. La medición manual de las zonas de inhibición puede llevar un tiempo excesivo. Sin embargo, existen dispositivos automáticos que permiten leer las zonas y que pueden integrarse en sistemas de procesamiento de datos y de informes de laboratorio. Los discos deben distribuirse equitativamente de forma que las zonas de inhibición alrededor de los discos antimicrobianos en la prueba de difusión en disco no se solapen hasta tal punto que no pueda determinarse la zona de inhibición. Generalmente esto se puede conseguir si los discos no están a más de 24 mm, desde el centro de un disco al centro del otro, aunque

esto depende de la concentración de los discos y de la capacidad del antimicrobiano para difundirse en agar. (46)

1.15.3.2 MÉTODOS DE DILUCIÓN EN UN MEDIO LÍQUIDO Y EN UN MEDIO SÓLIDO

La finalidad de estos métodos es determinar la concentración más baja del antimicrobiano ensayado que es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria analizada (MIC, concentración mínima inhibitoria, que normalmente se expresa en mililitros o miligramos/litro). Sin embargo, la MIC no siempre representa un valor absoluto. La "verdadera" MIC es un punto que se encuentra entre la concentración más baja del ensayo que inhibe el crecimiento de la bacteria y la siguiente concentración más baja del ensayo. Por tanto, se puede considerar que las determinaciones de la MIC utilizando una serie de diluciones tienen una variación inherente de una dilución. (46)

El rango de los antimicrobianos debería abarcar tanto los criterios de interpretación (sensibilidad, valor intermedio y resistencia) para una combinación específica entre bacteria y antibiótico como los microorganismos de referencia apropiados para el control de calidad.

Los métodos para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos que se basan en diluciones parecen ser más reproducibles y fáciles de cuantificar que los basados en difusión. Sin embargo, los antibióticos se ensayan normalmente mediante diluciones seriadas reduciendo la concentración a la mitad, lo que puede originar datos inexactos relativos a la MIC.

Cualquier laboratorio que pretenda usar un método de dilución y utilizar sus propios reactivos y diluciones de antibióticos debería tener la capacidad de obtener, preparar y mantener un stock de soluciones de antimicrobianos con una pureza adecuada y generar diluciones de trabajo de modo regular. Por consiguiente, es importante que tales laboratorios usen microorganismos de control garantizado para asegurar la precisión y estandarización en sus procedimientos. (46)

1.15.3.3 DILUCIÓN EN CALDOS DE CULTIVO

La dilución en medio líquido es una técnica en la que se prueba una suspensión de bacterias de una concentración predeterminada, óptima y apropiada frente a varias concentraciones de un agente antimicrobiano (normalmente mediante diluciones seriadas dobles) en un medio líquido de formulación documentada y predeterminada. El método se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 ml (macrodilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de microtitulación (microdilución). Existen en el mercado varios tipos de placas de microtitulación que contienen antibióticos prediluidos dentro de los pocillos de las placas. El uso de lotes idénticos de estas placas de microtitulación puede ayudar a reducir al mínimo la variación que puede surgir durante la preparación y dilución de los antimicrobianos que proceden de diferentes laboratorios. Dicho uso, junto a un protocolo de prueba documentado, que incluya la especificación de los microorganismos de referencia apropiados, facilitará la equivalencia de resultados entre laboratorios. Debido a que en la actualidad la mayor parte de las pruebas para antimicrobianos mediante microdilución en medio líquido se preparan comercialmente, este método es menos flexible que el basado en la dilución en medio sólido o en la difusión en disco en cuanto a su capacidad para admitir cambios necesarios derivados del programa de control y seguimiento. Como la compra de placas antimicrobianas y de la infraestructura necesaria puede ser costosa, esta metodología no es viable para algunos laboratorios. (46)

1.15.3.4 DILUCIÓN EN MEDIO SÓLIDO

La dilución en medio sólido implica la incorporación de concentraciones variadas de agentes antimicrobianos, en un medio solidificado con agar, utilizando generalmente diluciones seriadas dobles y la aplicación de un inóculo bacteriano definido a la superficie de la placa que contiene el agar. A menudo, los resultados derivados de estos ensayos se consideran como los más fiables para la determinación del valor MIC para una determinada combinación bacteria/antimicrobiano en una prueba concreta.

Las ventajas de los métodos de dilución en medio sólido son:

- La capacidad de ensayar simultáneamente varias bacterias, excepto las que se acumulan, en una misma placa de medio con agar.
- La mejora potencial en cuanto a la determinación de valores MIC por extensión del rango de concentraciones del antimicrobiano. La posibilidad de semi-automatizar el procedimiento mediante la utilización de un replicador del inóculo. Existen en el mercado unos replicadores de los inóculos que pueden transferir entre 32 y 36 inóculos bacterianos diferentes a cada una de las placas con medio sólido.

Los métodos de dilución en medio sólido tienen algunos inconvenientes; por ejemplo:

1. Si no están automatizados, son muy laboriosos y requieren importantes recursos económicos y técnicos.
2. Una vez preparadas las placas deben utilizarse al cabo de una semana.
3. Los puntos finales no son siempre fáciles de determinar ni resulta fácil verificar la pureza del inóculo.

La dilución en medio sólido se recomienda a menudo como un ensayo estandarizado para medir la sensibilidad a los antimicrobianos de microorganismos difíciles de cultivar, como es el caso de los anaerobios y las especies *Helicobacter* y *Campylobacter*. (46)

1.16 OTRAS PRUEBAS PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS Y LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS ESPECÍFICOS

Las concentraciones mínimas inhibitorias de los antimicrobianos para bacterias se pueden obtener también mediante tiras de gradientes disponibles en el mercado que permiten la difusión de una concentración de antibiótico predeterminada. Sin embargo, el uso de tiras de gradientes puede ser muy caro y originar discrepancias en cuanto a la MIC cuando se prueban ciertas combinaciones de bacterias con antimicrobianos y se comparan con las obtenidas mediante dilución en medio sólido. Cualquiera que sea el

método usado, los procedimientos deberían documentarse detalladamente para lograr resultados exactos y reproducibles. Cada vez que se realiza una prueba de sensibilidad a los antimicrobianos se necesita probar también los microorganismos de referencia apropiados para asegurarse de la exactitud de los resultados.(30)

La elección apropiada del sistema para determinar la sensibilidad dependerá, en último término, de las propiedades del crecimiento de la bacteria en cuestión. En circunstancias especiales, pueden resultar adecuados nuevos métodos para la detección de fenotipos de resistencia particulares. Por ejemplo, pruebas basadas en cefalosporinas cromogénicas (8) (como nitrocefín), pueden revelar resultados rápidos y fiables sobre determinación de beta-lactamasas en algunas bacterias, ya que la resistencia inducible a la clindamicina en *Staphylococcus* spp. puede detectarse utilizando el método de difusión en disco empleando discos de cindamicina y eritromicina estándar en posiciones adyacentes y midiendo las zonas de inhibición resultantes (como la zona D). (30) (83)

De modo similar, puede detectarse un amplio espectro de actividad beta-lactamasa en algunas bacterias mediante métodos estándar de sensibilidad por difusión en disco incorporando cefalosporinas específicas (cefotaxima y ceftazidima) en combinación con un inhibidor de beta-lactamasas (como el ácido clavulánico), y midiendo las zonas de inhibición resultantes. Además, la resistencia al cloranfenicol atribuible a la producción de cloranfenicol-acetil transferasa se puede detectar en algunas bacterias mediante pruebas rápidas en un tubo o en papel de filtro en cuestión de 1–2 horas. También puede detectarse la proteína 2a (PBP 2a) de unión a la penicilina en estafilococos resistentes a la meticilina con una prueba de aglutinación en latex. (30) (83)

1.17 ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE MITSCHER

Se basa en el crecimiento exponencial de bacterias susceptibles inoculadas en superficie o profundidad en los medios de cultivo adecuados, inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de agar. Este procedimiento ofrece una distribución homogénea del

compuesto en el agar. En este método una cantidad conocida de muestra es diluida en agar, siendo indispensable la dispersión homogénea de la muestra en agua. (83)

1.18 ESTUDIOS CIENTIFICOS Y APLICACIONES TRADICIONALES

En la amazonia ecuatoriana, la infusión de Mantin Galvis (*Senna multijuga*) se emplea como antiinflamatorio.

En la Universidad Federal de Juiz de Fora, Laboratorio de productos Naturales Bioactivos, de Brasil, se realizó un estudio sobre la actividad antimicrobiana y antioxidante de algunos extractos de plantas en el que incluyen *Senna multijuga*, obteniendo resultado positivo para la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), utilizan además otras cepas que no incluyen las de este trabajo. (54)

Plantas de la especie de Tagetes, demuestran en algunas de sus especies actividad antimicrobiana frente a determinados microorganismos.

En la revista Iberoamericana de Micología de Colombia se publicó un estudio de la Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae, cuyo objetivo era evaluar in vitro dicha actividad sobre algunas cepas ATCC distintas de este estudio, obteniendo resultados positivos para *Tagetes zipaquirensis*. (86)

.

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en la Facultad de Ciencias:

- Laboratorio de Fitoquímica
- Laboratorio de Microbiología

2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MATERIALES

2.2.1.1 MATERIAL VEGETAL

Vegetales completos limpios y frescos de:

-Zorillo (*Tagetes zipaquirensis*), y Alberjilla (*Coursetia dubia*), recolectadas en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

-Martin Galvis (*Senna multijuga*), recolectada en la Amazonia Ecuatoriana (Puerto del Carmen).

2.2.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Escherichia coli* ATCC 9637
- *Salmonella gallinarum* ATCC 9184

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

2.2.1.3 MATERIAL DE LABORATORIO

- | | |
|--|--|
| - Tubos de ensayo | - Probetas |
| - Vasos de precipitación | - Lámpara de alcohol |
| - Cápsulas de porcelana | - Erlenmeyer |
| - Papel filtro | - Trípode |
| - Balones esmerilados de 1000mL. | - Piceta |
| - Balones aforados de 25, 100mL. | - Embudo |
| - Pipetas de 1, 5 ,10mL | - Cajas Petri |
| - Pinzas para tubos | - Asa de platino |
| - Crisol | - Pera de succión |
| - Gradillas | - Parafilm |
| - Embudo simple y bucher | - Gasas estériles |
| - Barrilla de vidrio | - Cinta testigo |
| - Matraces | - Aplicadores |
| - Papel aluminio | - Puntas estériles para micro
pipetas |
| - Papel toalla absorbente | - Micro pipetas de 10, 20, 50, 100,
500, 1000 |
| - Frascos ámbar de 10, 30,50,4000
ml. | - Fundas de tela para esterilización |
| - Gorros folliodress | - Termómetro |
| - Algodón | - Cinta adhesiva |
| - Reverbero | - Tapones de caucho para tubos |
| - Caja de guantes | - Embudo de Separación |
| - Hojas de bisturí | - Mandil Blanco |
| - Mascarilla 3M | |
| - Espátula | |

2.2.2 EQUIPOS

- Rotavapor (HEIDOLPH TYPE HEIZBAD HEI-VAP)
- Balanza analítica (BOECO)
- Desecador
- Cámara Fotográfica
- Refrigerador (ECASA)
- Autoclave
- Estufa (MEMMERT)
- Estufa de Cultura (FANEM MOD: 002CB)
- Cámara UV
- Refractómetro
- Espectrofotómetro
- Bomba de presión
- Baño María
- Ultrasonido
- Esterilizador Vía seca
- Vortex MRC
- Computadora

2.2.3 REACTIVOS

- Agua destilada
- Alcohol potable 96%
- Ácido clorhídrico al 1%
- Reactivo Dragendorff
- Reactivo Wagner
- Reactivo Sudan III
- Reactivo de Borntrager
- Reactivo Mayer
- Cloroformo
- Anhídrido acético
- Ácido sulfúrico concentrado
- Hidróxido de potasio o Sodio
- Reactivo de Baljet
- Hidróxido de Sodio
- Metanol
- Solución de carbonato de sodio
- Tricloruro férrico al 5%
- Suero Fisiológico
- Solución de Ninhidrina al 5%
- Ácido sulfúrico concentrado
- Eter Dietílico
- Ácido clorhídrico concentrado
- Limaduras de magnesio metálico
- Alcohol amílico
- Éter
- DMSO
- Solución de Urea al 20%
- Caldo de soya tripticasa MERCK
- Agar de soya tripticasa MERCK
- Agar Sauboraud MERCK

- Agar Base sangre MERCK
- Agar EMB MERCK
- Agar Manitol MERCK
- Agar SIM MERCK
- Reactivo de Ehrlich
- Agar con urea de Christensen
MERCK
- Agar citratado de Simmons
MERCK

2.3 MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.3.1 RECOLECCIÓN

El vegetal Zorillo (*Tagetes zipaquirensis*), se recolectó en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH a 1750 m.s.n.m, el 06 de Junio del 2012, teniendo en cuenta el criterio de que, debe estar en flor (amarillas), sus hojas son verdes y pinnadas (4-6 pares de pinnas), poseen glándulas multicelulares de color anaranjado que emanan un olor bastante fuerte.

La Alberjilla (*Coursetia dubia*) se recolectó en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH a 1750 m.s.n.m, el 06 de Junio del 2012 en base al criterio de que debe estar con vainas tiernas son planas y con semillas pequeñas, sus hojas generalmente alternas, pinnadas, compuestas y con estípulas. Las flores, se presentan de diciembre a mayo, son de color rosado, se vuelven blancas con la edad.

La *Senna multijuga* se recolectó en la Amazonia Ecuatoriana, Puerto del Carmen a 900-1300 m.s.n.m, se trata de un árbol de hasta 12 m de alto, el mismo debe estar en flor (amarillas) y están dispuestas en racimos axilares y terminales de 5 a 10 cm de largo incluyendo el peciolo, sus frutos se tratan de vainas de 10 a 15 cm de largo aplastadas con numerosos septos angostos y paralelos, cada septo contiene una semilla aplastada de 1 cm de largo y de color pardo brillante, sus hojas de color verde opaco, dispuestas en espiral. paripinnadas, de 5 a 13 cm de largo incluyendo el peciolo.

2.3.2 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

Se tomó la planta con todas sus partes, se procedió a prensarla y se llevó al herbario de la ESPOCH, dirigido por el Ing. Jorge Caranqui, quien identificó y certificó los ejemplares.

2.3.3 PROCESAMIENTO DE MATERIA PRIMA: LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

- Se tomó las plantas con todas sus partes y se eliminan sus partes secas y dañadas, impurezas y cuerpos extraños.
- Se lavó con abundante agua.
- Se sumergió el material vegetal en una solución de hipoclorito de Sodio al 1%.
- Se volvió a lavar las plantas con agua hasta eliminar el Hipoclorito por completo
- Se dejó escurrir a temperatura ambiente por 12 horas, hasta secarla.
- Se procedió a triturar todas las plantas lo más finas posible.
- Se almacenó la droga evitando contacto con luz y humedad en bolsas de papel de ser posible estériles o de plástico.

2.3.4 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS INICIALES

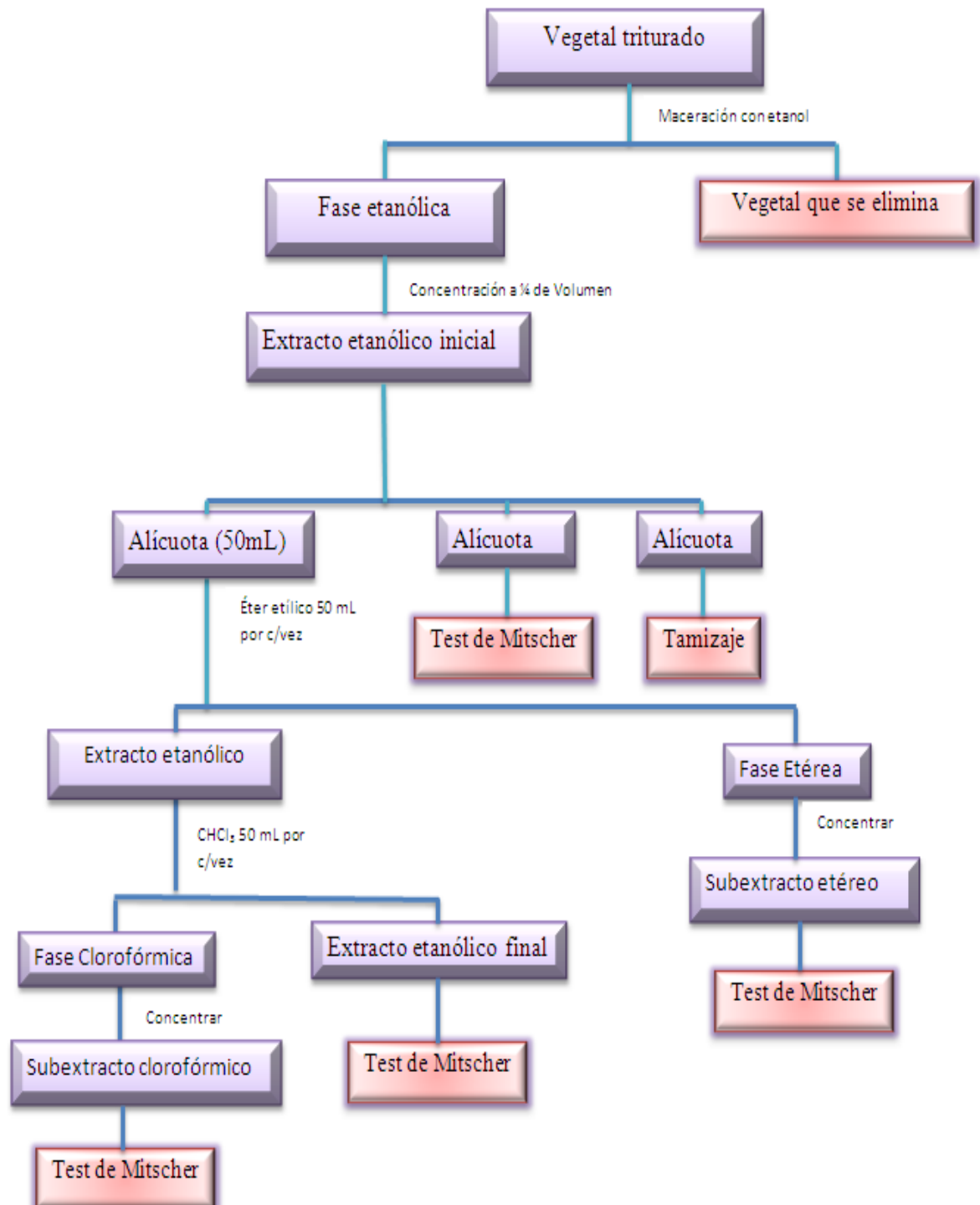
Este proceso se realizó para las tres especies vegetales objeto de este estudio.

1. En un recipiente de vidrio ámbar grande con su respectiva tapa, se transfirió 600g de droga cruda fresca triturada y pesada, la misma que se humedece directamente con etanol a 96° (Generalmente se emplea por cada gramo de droga, 3mL de alcohol para la humectación). Se maceró por 72 horas.
2. A las 72 horas se filtro con algodón y se transfirió a un frasco ámbar de 500 ml todo el material líquido obtenido, y se concentró a $\frac{1}{4}$ de su volumen.
3. El producto así obtenido se envasó en recipiente de vidrio ámbar estéril y sellado con parafilm, apto para el desarrollo del estudio microbiológico. Se refrigeró a 4°C y se mantuvo fuera del alcance de la luz y humedad.

2.3.5 OBTENCION DE LOS SUBEXTRACTOS

1. Un volumen determinado de extracto etanólico se trato con solventes de menor constante dieléctrica e inmiscible para separar los metabolitos secundarios de acuerdo a su polaridad; generalmente se procesa en un embudo de separación al que se añade éter dietílico en la misma proporción del extracto, y se agitó suavemente
2. La extracción se lo realizó tantas veces fueron necesarias hasta que la parte etérea recobre su estado inicial transparente lo cual indico la extracción completa de los compuestos etéreos.
3. Como resultado del paso anterior se tiene todavía extracto etanólico al mismo que se le añadió 50mL de cloroformo, y se agito suavemente.
4. Se obtuvieron dos fases, pero en este caso el subextracto clorofórmico corresponde a la fase inferior, la misma que es separada cuidadosamente.
5. Se procedió a realizar las extracciones necesarias hasta que el cloroformo recobre su característica de color inicial, el número de veces que se extrae depende de la coloración de la solución extraíble.
6. El residuo de esta última extracción corresponde al extracto etanólico final.
7. Una vez así obtenidos los subextractos se procedió a la concentración al vacío en balones previamente pesados y secos para conocer el rendimiento de los mismos.
8. El producto que se obtuvo se envasó en frascos ámbar de vidrio, y se los conserva en refrigeración.

FIGURA No. 2. ESQUEMA DE PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y SUBEXTRACTOS



2.3.6 DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICAS DE LOS EXTRACTOS

- COLOR:

Se procedió a tomar un tubo de ensayo limpio y seco se llenó las 3 cuartas partes con el extracto etanólico, se procedió a observar el color a tras luz, la presencia de partículas y la transparencia.

-OLOR:

Se tomo un tira de papel secante aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se determinó con el olfato las características del producto.

-ASPECTO

Se analizo el aspecto externo, teniendo en cuenta la limpidez de la muestra de ensayo. Es decir la presencia o no de partículas.

-DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

Se pesó el picnómetro vacío y seco, posterior se lo llenó con la porción de ensayo manteniendo a temperatura ambiente, y se llevó el líquido al nivel empleado, con una tira de papel se extrajo el exceso y se secó exteriormente el picnómetro. Luego se pesó cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo.

En los resultados la densidad relativa se calculó con la siguiente fórmula:

$$\bar{J} = (P2-P1)/VP$$

Donde:

P1: peso del picnómetro vacío (g)

P2: peso del picnómetro con muestra (g)

VP: volumen del picnómetro (mL)

-DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Para ajustar el equipo, se colocó sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, y se seleccionó la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Se colocó una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cerró el termo prisma y se enfocó la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incidió sobre la apertura de entrada del prisma de medición, y se procedió igual que con el agua.

-DETERMINACIÓN DEL pH DE EXTRACTOS

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizó la determinación del valor del pH de la muestra. Se introdujo directamente los detectores del pH-metro en la muestra y se realiza la lectura.

2.3.7 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje se realizó en los extractos alcohólicos de las tres especies vegetales objeto de Estudio. Se toma 10 mL de extracto y se lo divide en tubos de ensayo, sobre los cuales se realiza las siguientes pruebas.

2.3.7.1.1 ENSAYO DE LA ESPUMA

Se añade sobre el extracto una proporción igual de agua, se agita vigorosamente y se observa.

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal comotriterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

2.3.7.2.1 ENSAYO DEL H₂SO₄ CONCENTRADO

Por la pared del tubo de ensayo se deja caer ácido sulfúrico concentrado, una coloración fuertemente amarilla indica la presencia de flavonas y flavonoides, las flavonas forman un complejo soluble color naranja o guinda, las chalconas y auronas forman coloraciones rojo-guinda a rojo-azulado. (6) (49)

2.3.7.2.2 REACCIÓN DE MARINI BETTOLO

Se añade al extracto 2 a tres gotas de reactivo (Tricloruro de Antimonio). Se calienta por 3 minutos, se deja enfriar y se observa.

Amarillo o anaranjado: Presencia de Flavonas

Rojo Oscuro o Violeta: Presencia de Chalconas

2.3.7.2.3 ENSAYO DE SHINODA

Permite determinar la presencia de flavonoides. En un tubo de ensayo se coloca una alícuota de extracto, y se agrega una pequeña cantidad de limaduras de Mg y unas gotas de HCl concentrado.

La reacción se considera positiva cuando se presenta coloración amarilla, naranja, carmelita, rosada o rojo guinda; intensos en todos los casos.

2.3.7.3.1 ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO

Se añade sobre el extracto de 2 a 3 gotas de Cloruro Férrico, y se observa.

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal.

1. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
2. Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
3. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalo-tánicos.

2.3.7.5.1 ENSAYO DE BORNTTRAGER

Con este ensayo se determina la presencia de quinonas, para lo cual se tomó una alícuota de extracto en un tubo de ensayo y se agregó gotas de NaOH5%, finalmente se añadió 1mL de cloroformo y se observó la coloración de la fase acuosa alcalina. El ensayo es positivo cuando se presenta las siguientes coloraciones:

- Amarillo para Benzoquinonas
- Rosado para Naftoquinonas
- Violeta para Antraquinonas

2.3.7.6.1 ENSAYO DE DRAGENDORFF

Este ensayo sirve para determinar la presencia de alcaloides, se añadió sobre una alícuota de extracto 3gotas del reactivo de Dragendorff, y se observa, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

2.3.7.6.2 ENSAYO DE WAGNER

Este ensayo determina la presencia de alcaloides, a la solución formada en el ensayo de Borntrager, se le evaporó el cloroformo, obteniéndose un residuo al que se añadió 1mL de EtOH, una gota de HCl y unas gotas del reactivo de Wagner (2g de yodo y 2g de

yoduro de potasio aforados a 100mL con agua), se agitó suavemente, los resultados se clasifican así:

Opalescencia: (+)

Turbidez definida: (++)

Precipitado: (+++)

2.3.7.7.1 ENSAYO DE ROSENTHALER

Permite comprobar en los extractos etanólicos la presencia de terpenos. Se tomó una alícuota de extracto etanólico, se adicionó gotas de reactivo de Rosenthaler (solución 1% de vainillina en EtOH y 5mL de H₂SO₄ concentrado) y se calentó. Se considera positivo cuando se forma una coloración en gama de rosada a violeta o pardas.

2.3.7.8.1 ENSAYO DE BALJET

En un tubo de ensayo se colocó una pequeña porción de extracto etanólico y se añadió 2-3 gotas de Ácido Pícrico y gotas de KOH 5%.

Una coloración anaranjada o rojiza indica que la prueba es positiva para sesquiterpenolactonas.

2.3.7.9.1 ENSAYO DE SUDAN III

Con este ensayo se determina la presencia de monoterpenos, entonces, se añadió a la muestra 1mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III (solución al 6% en partes iguales de alcohol y glicerina.) Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente.

La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente. (26) (28) (42)

2.3.7.10.1 ENSAYO DE LIEBERMANN-BURCHARD

Mediante esta reacción se determina triterpenos, esteroides y esteroides. En un tubo se colocó una alícuota de extracto etanólico, se evaporó a sequedad. Se disolvió el evaporado en 1mL de CHCL₃, y se añadió, por las paredes del tubo, 1mL de reactivo (anhídrido acético: H₂SO₄ 40:1), sin agitar.

Si forma un anillo verde la prueba será positiva o puede darse el siguiente cambio (rápido) de coloración de verde-azul, pasando por verde intenso hasta llegar a negro en la interfase.

2.3.8 DETERMINACIÓN DE MATERIA SECA DE LOS EXTRACTOS Y SUBEXTRACTOS

El ensayo se realizó en los extractos y subextractos con el fin de conocer el volumen exacto que se debe tomar para efectuar el test de Mitscher ya que solicita en su técnica 400 mg de extracto.

- 1.-Se tararon 12 crisoles a peso constante.
2. - Se tomó 1000 uL de cada extracto y subextracto y se los colocó en los crisoles.
3. - Todos los crisoles fueron dejados en la estufa hasta peso constante.
4. –Se toma nota de los pesos así obtenidos y se calcula la cantidad total de materia seca presente en 1000 uL de cada uno de los extractos y subextractos.
- 5.- De esta manera entonces se llegó a conocer la cantidad de volumen necesarios que se debe tomar para el teste de Mitscher.

2.3.9 REACTIVACIÓN DE CEPAS MICROBIOLÓGICAS ATCC

2.3.9.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS

A. PREPARACIÓN DE CALDO DE CULTIVO SOYA TRIPTICASA

Se preparó una cantidad suficiente de caldo soya tripticasa y se reparten 25mL en 6 erlenmeyers individuales de 125mL previamente estériles, con tapones de gasa y algodón. Se autoclavó a 121°C, 15 psi por 30 minutos y se enfrió para la suspensión de bacterias.

B. PREPARACIÓN DE AGAR BASE SANGRE, AGAR EOSINA-AZUL DE METILENO, AGAR SABOURAUD Y AGAR MANITOL

Se preparó una cantidad suficiente de agar base sangre, eosina, saboraud y manitol en 6 erlenmeyers de 1000mL respectivamente. Se llevaron a ebullición y se autoclavaron a 121°C, 15 psi durante 30 minutos. Ya preparados y esterilizados se repartió en cajas petri una cantidad de 15mL. Al enfriar se invirtieron y almacenaron en refrigeración en bolsas plásticas.

En el caso de agar base sangre, una vez preparado y esterilizado el medio se dejó enfriar hasta una temperatura de 45-50°C y se le añadió en condiciones asépticas, del 15 al 10 % de sangre. Seguidamente se homogenizó y se repartió en cajas petri.

C. PREPARACIÓN DE AGAR PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se preparó una cantidad suficiente de agar Kligler, agar SIM, agar citratado de Simmons y Urea en 6 erlenmeyer de 500 mL respectivamente. Se llevaron a ebullición y se autoclavaron a 121°C, 15 psi durante 30 minutos. Se enfriaron a temperatura ambiente. Se repartió 3mL de cada agar preparado en tubos de 75x100mL previamente estériles con su tapa. Se inclinaron con el pico flauta bastante largo, sin que el mismo tope el tapón de caucho, procurando que este tenga 1 cm de altura en la base excepto SIM, el mismo que se dejó enfriar en posición vertical. En el caso de Urea al bajar la

temperatura se colocó una cantidad suficiente de reactivo de úrea al 20% previamente estéril y filtrada y se procedió de la misma manera.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se los almacena en gradillas con fundas plásticas en refrigeración.

D. PREPARACIÓN DE REACTIVO DE EHRLICH

Se utiliza la siguiente fórmula:

- Para-dimetil minobenzaldehído: 2g.
- Alcohol etílico de 95°: 190 mL.
- Ácido clorhídrico concentrado: 40 mL.

Disolver el aldehído con el alcohol y agregar lentamente el ácido con agitación constante. El reactivo es de color amarillo y se almacena protegido de la luz en un frasco ámbar previamente estéril a 4°C.

E. PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE ÚREA

Para el estudio se realizó una solución de úrea al 20%. Pesar 20 gramos de úrea deshidratada y disolver en 100mL de agua destilada. Si es necesario esterilizar por filtración. Almacenar protegido de la luz a temperatura de 4°C.

F. PREPARACIÓN DE AGAR SOYA TRIPTICASA (TSA)

Se preparó una cantidad suficiente de agar Soya Trypticase (TSA), se llevó a ebullición y se repartió 6 mL en tubos individuales 100x13 mL de capacidad. Se autoclavaron a 121°C, 15 psi por 30 minutos. Los tubos con TSA se colocaron a un ángulo aproximado de 45° de manera que puedan inclinarse y se solidifiquen. Se pueden mantener a temperatura ambiente hasta el momento de usar, bien tapados y envueltos en fundas plásticas.

2.3.9.2 SUSPENSIÓN DE MICROORGANISMOS ATCC

Se verifica las cepas ATCC encontradas y almacenadas en el laboratorio y con ayuda de hisopos estériles se tomó una cantidad adecuada y se suspendieron a un ángulo de 45° en cada erlenmeyer (previamente codificado) que contiene los 25mL de caldo soya tripticasa. Se incubaron a 35°C durante 24 horas.

2.3.9.3 SIEMBRA DE MICROORGANISMOS ATCC

Se verifica si existe crecimiento de los microorganismos que deseamos reactivar, para ello nos fijamos en la turbidez de los erlenmeyer lo cual es el primer indicativo. Por medio de un asa estéril, y enfriándola en las paredes del erlenmeyer, se introdujeron para obtener una pequeña cantidad de muestra y se sembraron en las respectivas cajas Petri codificadas que contienen agar sangre, EAM y Saubouraud, éste último en el caso de *Candida albicans*. Se incuban a 35°C por 24 horas.

2.3.9.4 LECTURA DE CAJAS INCUBADAS

Se tomaron las cajas petri sembradas del día anterior y se observó si existe crecimiento en cada una de ellas. Se observaron las características macroscópicas de cada colonia y se realizan las pruebas bioquímicas necesarias para verificar si el microorganismo obtenido es el deseado o una contaminación.

PROCEDIMIENTO

1. En el caso de *Staphylococcus aureus* se debe tomar una colonia crecida en agar sangre con el asa estéril y se siembra en agar Manitol. Se deja incubar a 35°C por 24 horas.
2. En el caso de *Candida albicans* la observación macroscópica es clara en agar Saubouraud y su olor. Pero se realiza un fresco y Gram para determinar microscópicamente las colonias de hongos.

3. Las características macroscópicas en agar EMB de *Escherichia coli* son suficientes para verificar la bacteria sin embargo se realiza pruebas bioquímicas, como a todas las enterobacterias y bacterias Gram negativas.
4. Para la realización de pruebas bioquímicas se toma una colonia crecida en EMB con aguja de inoculación estéril y se siembra en cada una de las pruebas bioquímicas esto es en Kligler, Citrato y Urea, en agar pico flauta se hace picadura y estriamiento, mientras que para la prueba de Indol se inocular en picadura hasta 1cm de altura de la base del agar. Los tubos se dejan incubar a 35°C semi-tapados por 18 horas.

En caso de no existir crecimiento en las cajas petri, se siembra nuevamente.

2.3.9.5 ALMACENAMIENTO DE MICROORGANISMOS ATCC REACTIVADOS

Al obtener y comprobar la existencia de las cepas reactivadas de los microorganismos ATCC, con un asa estéril se tomó una asada directamente de agar EMB o de las pruebas bioquímicas realizadas (Manitol en el caso de *S. aureus*; Kligler en el caso de *E. coli*) y se sembraron por estriamiento en tubos codificados de TSA que se mantuvieron almacenados a temperatura ambiente. Se incubaron por 18-24 horas a 35°C. Al día siguiente se almacenan en gradillas y se realiza un sellado hermético para evitar la contaminación.

2.4 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE MITSCHER EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, *Coursetia dubia*.

2.4.1 PREPARACIÓN DE MEDIOS. (Día 1)

A. PREPARACIÓN DE SUERO FISIOLÓGICO (0,85%)

Se preparó 100mL de suero fisiológico al 0,85% y se coloca en un envase de tapa rosca, seco y libre de impurezas que proteja al producto de la luz. Se autoclavó a 121°C por 30 minutos, semi-tapado de manera que el vapor esterilice el producto. Puede mantenerse en refrigeración a 4°C hasta el momento de usar.

B. PREPARACIÓN DE AGUA ESTÉRIL

Se colocó 200mL de agua destilada en un envase de tapa rosca, seco y libre de impurezas. Se autoclavó a 121°C por 30 minutos. Se mantiene en refrigeración hasta el momento de usar.

C. ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES

Se preparó todo el material necesario para realizar el estudio por triplicado. Estos materiales sean de vidrio o plástico se los colocan en fundas de tela etiquetadas, clasificándolos en tubos, tapas, viales, balones, puntas, etc. Se autoclavaron a 121°C durante 50-55 minutos. Se coloca en una estufa para secarlas a 90°C y se almacena en un lugar aséptico en las mismas fundas de tela sin abrirlas hasta el momento de usarlos.

2.4.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ENSAYO (Día 2)

A. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO PARA EL ENSAYO

Se tomó el extracto seco y se colocó en viales estériles y secos, bien tapados y se mantuvo protegido de la luz y el calor.

Se tomó un vial estéril y seco y se pesó en una balanza analítica e informo resultados. Con un aplicador de punta estéril se pesó con precisión 40mg de extracto en el vial. Se añadió 400µL. de DMSO y se disolvió con ayuda de ultrasonido.

Se tapa y se deja en reposo hasta el momento de su uso. A éste vial lo codificamos con el nombre de la planta.

B. PREPARACIÓN DE CALDO SOYA TRIPTICASA (TSB)

Se preparó una cantidad suficiente de caldo de Soya Triptica (TSB) y se repartió 25 ml en 6 erlenmeyer individuales de 125 mL de capacidad, previamente esterilizados. Se autoclavaron a 121°C por 30 minutos.

C. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
3. *Candida albicans* ATCC 10231
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
5. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
6. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184

- Se llevó a temperatura ambiente los 6 erlenmeyer que contenían 25 mL de TSB estéril y se codifico con el nombre de los microorganismos ATCC y la fecha.

- Utilizando aplicadores estériles se tomó una cantidad de los microorganismos ATCC de los tubos inclinados (TSA) que los contienen y se transfirieron independientemente a los erlenmeyer codificados.
- Los erlenmeyer se incubaron a 35°C por 18-24 horas.

D. PREPARACIÓN DE AGAR SOYA TRIPTICASA (TSA)

Se preparó 630mL de agar soya triptica (TSA) y se repartió 15mL en 42 tubos 25X150 mm de pírex individuales cada uno con su tapa o tapón. Se autoclavaron a 121°C por 15 minutos. Se mantienen a 45°C hasta el momento de usarlos.

E. PREPARACIÓN DE CAJAS PETRI CON EL EXTRACTO

- Se inicia con el vial de la disolución del extracto en DMSO, que se codificó con el nombre del extracto de la planta. Cuya concentración final del extracto fue 10.000 µg/mL. El estudio es por triplicado por lo tanto el mismo procedimiento hacemos tres veces.
- Se codificó las cajas Petri estériles con el nombre del extracto, la concentración final y el tratamiento (tres cajas para cada concentración 10.000, 1000, 100 µg/ml).
- En un tubo con TSA estéril a 45°C, se adicionó 100µL de la disolución del extracto en DMSO, se mezcla con ayuda del vortex e inmediatamente dispensamos en una caja petri codificada y se dejó en reposo hasta solidificarla.
- Se realizó una dilución al décimo, utilizando tubos de ensayo de 75x100 limpios, secos y estériles a los que se ha añadido 900 µL de DMSO y 100 µL del extracto de la concentración 10.000 µg/mL y así obtenemos una dilución 1/10, dando una concentración final de 1000 µg/mL.
- Se pipeteó 100 µL de la disolución de concentración 1000 µg/mL a los tubos 25x150mm pírex que contenían 15 ml de TSA 45°C. Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se pasaron a las cajas Petri previamente codificadas con el nombre del extracto y de la concentración y tratamiento. Se dejaron solidificar.

- Se realiza otra dilución 1/100 en tubos de ensayo de 75x100 limpios, secos y estériles a los que se ha añadido 900 µL de DMSO y 100 µL del extracto de la concentración 1000 µg/mL, obteniendo una concentración final de 100 µg/mL.
- Se pipeteó 100 µL de la dilución de concentración 100 µg/mL a los tubos 25x150mm pirex grandes que contenían 15 ml de TSA 45°C. Se mezclaron en el vortex e inmediatamente se dispensaron en las cajas petri previamente codificadas.
- Una vez solidificado el medio de cultivo que contienen los extractos se invirtieron las cajas y se dejaron a temperatura ambiente por 18-24 horas, dentro de una bolsa de tela.

F. PREPARACIÓN DE CAJAS BLANCO

- Se codificaron 6 cajas petri estériles con el nombre de blanco (3 cajas TSA, 3 DMSO).
- Se tomaron tubos de TSA 45°C e inmediatamente se colocaron en las cajas petri previamente codificadas con el nombre blanco TSA. Dejar solidificar.
- Se pipetearon 100 µL de DMSO a los tubos que contenían TSA 45°C. Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se dispensaron a las cajas petri previamente codificadas con el nombre blanco + DMSO. Dejar solidificar.

2.4.3 PREPARACIÓN DE LA SIEMBRA (Día 3)

A. PREPARACIÓN DE CAJAS PETRI

- Las cajas petri preparadas en el día 2 no deben tener contaminación alguna, si la tienen, se desechan y se debe repetir su preparación con más cuidado.
- Todas las cajas petri se dividieron con marcador en seis partes iguales y se marcaron del 1 al 6, representando cada uno a los microorganismos testados.

B. PREPARACIÓN DE SUSPENSIONES SALINAS DE LOS MICROORGANISMOS

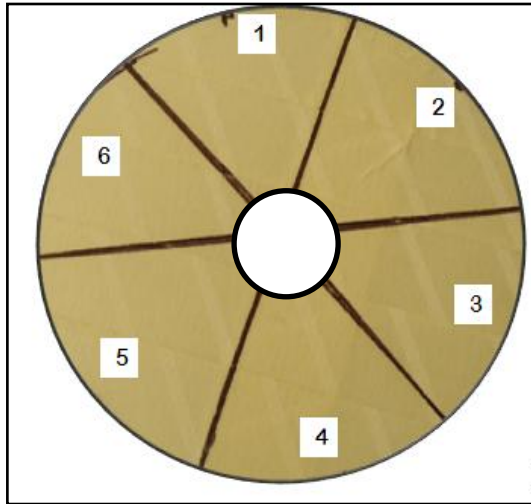
- Se colocó 10mL de suero fisiológico en 6 tubos de 15x150 limpios, secos y estériles. Se mantuvieron a temperatura ambiente y se codificaron con el nombre de cada microorganismo.
- Sacamos los erlenmeyer incubados por 24 horas desde el día anterior a 35°C, debiendo estar visiblemente turbios, y se mezcla ligeramente para evitar sedimentos, a partir de éstos se realizaron las suspensiones de los microorganismos.
- Se pipeteó 100 µL de la suspensión, a los tubos que contenían los 10 mL de suero fisiológico 0,85%. Se mezclaron con ayuda de un vortex. Siendo éstas las suspensiones:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
100 µL susp. /10 mL sol. Salina
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
100 µL susp. /10 mL sol. Salina
3. *Candida albicans* ATCC 10231
1000µL susp. /10mL sol. Salina
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
100 µl susp. / 10 ml sol. Salina
5. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
100 µl susp. / 10 ml sol. Salina
6. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184
100 µl susp. / 10 mL sol. Salina

C. ESTRIADO DE MICROORGANISMOS

- A partir de las suspensiones de los microorganismos en la solución salina y utilizando varias asas de platino (6 asas microbiológicas con una capacidad de 5 µL) esterilizadas y enfriadas entre un estriado y otro, se tomó una asada de cada

microorganismo en su turno y se estrió en un patrón radial en cada caja petri, a 0,5cm del borde la caja y del centro de la misma, siguiendo la plantilla.



FOTOGRAFIA No. 5. PLANTILLA DEL TEST DE MITSCHER PARA EL ESTRIADO DE MICROORGANISMOS

- Las suspensiones de los microorganismos se agitaron en un tiempo determinado para evitar la sedimentación.
- Al compartir la labor del estriado se estrió todas las cajas petri con un microorganismo dado. Por ejemplo iniciamos con *Staphylococcus aureus*, estriamos todas las cajas con esa misma bacteria y finalizado iniciamos con la bacteria dos.
- Cuando todas las cajas petri fueron estriadas con todos los microorganismos se invirtieron y se incubaron a 35°C por 18-24 horas. Se incuban boca abajo para evitar que gotas de agua condensada puedan caer sobre los microorganismos y dispersen su crecimiento. Es necesario dejar incubar por 18-24 horas más, es decir total 48 horas.

2.4.4 LECTURA DE RESULTADOS (Días 4 y 5)

- Las cajas se sacaron de la incubadora y fueron examinadas el día cuatro, contra los blancos.
- Si todos los cultivos crecieron, el examen es válido. Si alguno no creció se debe, reincubar y leer el día cinco.
- Las cajas petri se sacan de la incubadora y se examinan, es más apropiado realizar la lectura al quinto día (especialmente por el crecimiento de *Candida albicans*).

- Existe actividad antibiótica cuando no hay crecimiento visible en las cajas rayadas. La concentración inhibitoria mínima CIM es la menor concentración de las diluciones en la cual no hay crecimiento del microorganismo.
- A éste estudio se lo clasifica en tres parámetros de lectura:

A = Activo (No existe crecimiento)

P= Parcialmente Activo (poco crecimiento)

I= Inactivo (existe crecimiento)

- Si el microorganismo es morfológicamente alterado, por ejemplo si *P. aeruginosa* no muestra su pigmento verde característico, o si no crece bien, la caja puede ser registrada como P.
- Las cajas petri de control debe tener la apariencia esperada (crecimiento en todas las líneas en las cajas de control negativo blanco.
- La presencia de pocas colonias en una raya es señal de resistencia. La presencia de pocas colonias aisladas en la caja lejos de la línea rayadas, es señal de contaminación se pueden generalmente ignorar. (44)

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS INICIALES DE *Martin galvis* (*Senna multijuga*), *Zorillo* (*Tagetes zipaquirensis*), y *Alberjilla* (*Coursetia dubia*)

3.1.1 DESCRIPCION ORGANOLÉPTICA

CUADRO No.1. RESULTADOS DE PROPIEDADES FISICAS Y REACCIONES DE COLORACIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS INICIALES.

PARÁMETROS	Martín galvis	Zorillo	Alberjilla
PESO DE MUESTRA	600 g	630	600
RENDIMIENTO DEL EXTRACTO	34,82	17,42	18,07
ASPECTO	Siruposo	Líquido fluido	Líquido
COLOR	Pardo oscuro	Amarillo Rojizo	Amarillo Claro
OLOR	Amaderado	Aromático picante fuerte	Amaderado
DENSIDAD	0,9629	1,0531	1,0355
INDICE DE REFRACCIÓN	1,368	1,362	1,359
pH	5,42	4,32	5,14
SAPONINAS	(-)	(-)	(-)
H ₂ SO ₄	(+)	(+++)	(++)
MARINI DETTOLO	(-)	(+++)	(-)
FeCl ₃	(-)	(+++)	(-)
BORNTRÁGER	(+++)	(-)	(++)
SHINODA	(+)	(+++)	(+)
DRAGENDORFF	(+)	(-)	(+)
WAGNER	(+)	(-)	(+)
ROSENTHALER	(-)	(-)	(-)
BALJET	(-)	(+)	(-)
LIEBERMAN- BUCHARD	(+++)	(-)	(+++)
SUDAN III	(++)	(+++)	(-)

(+++) Alto contenido del metabolito secundario

(++) Contenido leve del metabolito secundario

(+) Bajo contenido del metabolito secundario

(-) Ausencia del metabolito secundario

En Cuadro No.1 muestra los resultados de las propiedades físicas, y de coloración determinadas en los extractos etanólicos de Martin Galvis, Zorrillo y Alverjilla.

El rendimiento de Martin Galvis fue de 34.82% y el aspecto del extracto etanólico era siruposo característica que indica la presencia de azúcares, presentó un color pardo oscuro con olor amaderado, un pH de 5,42 ligeramente ácido, la densidad de 0,9629 g/mL cercano a la densidad del agua, un índice de refracción igual a 1,368, en el Tamizaje fitoquímico dio la presencia de antraquinonas, triterpenos, esteroides, esteroides, monoterpenos, flavonoides, flavonas, y alcaloides. Estos resultados concuerdan con la bibliografía de cierta manera es así que según Hering C. realizó pruebas histoquímicas en *Senna multijuga* indicó la presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, terpenos, y lípidos grasos.

En el caso del Zorrillo su rendimiento fue 17.42% y presentó un aspecto líquido-fluido, color amarillo rojizo y un olor aromático, picante fuerte, un pH de 4,32 ácido, la densidad 1,0531 g/mL cercana a la densidad del agua y su índice de refracción de 1,362, en el Tamizaje fitoquímico dio la presencia de compuestos tales como flavonas, flavonoides, monoterpenos, sesquiterpenolactonas, taninos catéticos. Concuerda de cierto modo con el trabajo de Camacho D., que en el Tamizaje fitoquímico que realizó sobre esta especie vegetal dio la presencia de compuestos tales como alcaloides, taninos y terpenos.

El extracto etanólico de la Alverjilla tuvo un rendimiento de 18.07%, es de aspecto líquido, presentó un color amarillo claro, olor amaderado, su pH de 5,14, una densidad similar a la del agua de 1,0355 g/mL y el índice de refracción de 1,359, en el Tamizaje fitoquímico dio positivo la presencia de flavonas, flavonoides, benzoquinonas, monoterpenos y alcaloides, se comparan estos resultados con la composición general de las Fabáceas y se tiene que en esta familia existe con frecuencia la presencia de taninos, flavonoides y terpenoides según un estudio por el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (Cuba), por lo que concuerdan de cierta modo.

CUADRO No. 2. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS SUBEXTRACTOS ETÉREOS Y CLOROFÓRMICOS DE Martin Galvis, Zorillo y Alberjilla.

	VOL EXTRACTO ETANÓLICO	SUBEXTRACTO O ETÉREO	% R	SUBEXTRACTO CLOROFÓRMICO	% R	EXTRACTO ETANÓLICO FINAL	% R
Martin Galvis	50 mL	13mL	26	0,5mL	1	35,4mL	70,8
Zorillo	50mL	1,75g	3	0,4mL	0,8	46mL	87,4
Alberjilla	50mL	4,5mL	9	0,2mL	0,4	42,7mL	85,4

En el cuadro No.2 indica el porcentaje de rendimiento obtenidos en la preparación de los subextractos y extracto etanólico final, luego de ser concentrados en el rotavapor, el volumen de extracto etanólico inicial del cual se parte corresponde a 50 mL, la especie vegetal Martin Galvis posee el mayor rendimiento en lo que se refiere a subextracto etéreo, seguido de la Alberjilla, y por ultimo el Zorillo, en lo que se refiere a extractos clorofórmicos poseen bajos rendimientos las tres especies, pero la que menor rendimiento presenta es la Alberjilla por lo tanto para la obtención de este subextracto se requiere partir de mayor cantidad de extracto etanólico inicial.

CUADRO No. 3 MATERIA SECA TOTAL PRESENTE EN LOS EXTRACTOS Y SUBEXTRACTOS de Mantin Galvis (*Senna multijuga*), Zorillo (*Tagetes zipaquirensis*), y Alberjilla (*Coursetia dubia*)

VEGETAL	TIPO DE EXTRACTO	MATERIA SECA mg/1000uL
<i>Senna multijuga</i>	Extracto Etanólico inicial	61,6
	Extracto Etanólico final	67,6
	Subextracto Etéreo	40,9
	Subextracto Clofórmico	10
<i>Tagetes zipaquirensis</i>	Extracto Etanólico inicial	162,20
	Extracto Etanólico final	178,3
	Subextracto Etéreo	(---)
	Subextracto Clofórmico	40
<i>Coursetia dubia</i>	Extracto Etanólico inicial	155,9
	Extracto Etanólico final	167
	Subextracto Etéreo	159,7
	Subextracto Clofórmico	170

El cuadro No. 3 muestra el total de materia seca presente en cada uno de los extractos y subextractos, con el fin de conocer el peso aproximado a tomar para la aplicación del Test de Mitscher. En el caso del subextracto etéreo de *Tagetes zipaquirensis* no se realizó este ensayo ya que se evaporó a sequedad completa, y el peso fue tomado directamente.

Por los resultados de este cuadro nos podemos dar cuenta que en lo que se refiere a la *Senna multijuga*, su concentración de masa seca total es bastante baja, lo que implica tomar mayor volumen para aplicar el test de Mitscher.

En cuanto a las otras dos especies vegetales su cantidad de materia seca es considerable y el volumen necesario para el test también lo fue.

CUADRO No. 4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANOLICOINICIAL DE *Senna multijuga*

MICROORGANISMOS	24 HORAS			48 HORAS		
	10000 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL	10000 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	I	I	I	I	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	I	I	I	I	I	I
<i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184	I	I	I	I	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	I	I	I	I	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	I	I	I	I	I	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	I	I	I	I	I	I

A=Actividad P=Parcialmente Activo I=Inactivo

De acuerdo a los datos expresados en el cuadro N°4, se puede observar que el extracto etanólico inicial de *Senna multijuga* carece de actividad antimicrobiana a concentraciones de 10000, 1000 y 100 µg/mL, por lo tanto se podría decir que se necesita una mayor concentración de extracto para que se efectúe un proceso de inhibición bacteriana

CUADRO No. 5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO FINAL Y SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICO DE *Senna multijuga*

MICROORGANISMOS	24 HORAS			48 HORAS		
	E. ETANÓLICO FINAL	S. ETÉREO	S. CLOROFÓRMICO	E. ETANÓLICO FINAL	S. ETÉREO	S. CLOROFÓRMICO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	I	A	I	I	A	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	I	I	I	I	I	I
<i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184	I	I	I	I	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	I	I	I	I	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	I	I	P	I	I	P
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	I	I	P	I	I	P

A=Actividad P=Parcialmente Activo I=Inactivo

Los datos del Cuadro N°5 muestran claramente la actividad a las 24 horas del subextracto etéreo de *Senna multijuga* frente a *Staphylococcus aureus*, indicando así que la porción que guarda la actividad antimicrobiana se encuentra principalmente en la parte etérea, es aquí en donde están los compuestos que guardan esta actividad, y entonces se diría que la ausencia de inhibición en el extracto total se debe a la poca concentración de compuestos etéreos en el mismo.

Existe además actividad antimicrobiana parcial para *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* por parte del suextracto clorofórmico.

CUADRO No. 6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO INICIAL DE *Tagetes zipaquirensis*

MICROORGANISMOS	24 HORAS			48 HORAS		
	10000 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL	10000 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	I	I	I	I	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	I	I	I	I	I	I
<i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184	I	I	I	I	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	I	I	I	I	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	A	A	I	A	A	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	I	I	I	I	I	I

A=Actividad P=Parcialmente Activo I=Inactivo

El extracto etanólico inicial de *Tagetes zipaquirencis* presentó actividad frente a *Candida Albicans* incluso a la concentración de 10000 y 1000 µg/mL y además la actividad permanece inalterable hasta las 48 horas, sin embargo pierde totalmente su actividad a la concentración de 100 µg/mL, se toma en cuenta entonces que, en el rango de 100 y 10 µg/mL, el microorganismo resiste al extracto y crece sin inconveniente.

CUADRO No. 7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EL EXTRACTO ETANÓLICO FINAL Y LOS SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICO DE *Tagetes zipaquirencis*

MICROORGANISMOS	24 HORAS			48 HORAS		
	E. ETANÓLICO FINAL	S. ETÉREO	S. CLOROFÓRMICO	E. ETANÓLICO FINAL	S. ETÉREO	S. CLOROFÓRMICO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	I	A	I	I	A	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	I	I	I	I	I	I
<i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184	I	P	I	I	P	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	I	P	I	I	P	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	I	A	I	I	A	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	I	A	I	I	A	I

A=Actividad P=Parcialmente Activo I=Inactivo

Los resultados del cuadro N°7 muestran, la presencia de actividad para 5 de los microorganismos en estudio, siendo esta únicamente inactivo para *Escherichia coli*, al parecer los resultados son bastante alentadores tomando en cuenta también que este subextracto etéreo se obtuvo a sequedad y se aplicó el peso casi exacto que solicita Mitscher en su técnica, la actividad antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* se mantiene incluso hasta las 48 horas, del mismo modo el subextracto etéreo mantiene la actividad parcial para *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella gallinarum*.

CUADRO No.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO INICIAL DE *Coursetia dubia*

MICROORGANISMOS	24 HORAS			48 HORAS		
	10000 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL	10000 µg/mL	1000 µg/mL	100 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	I	I	I	I	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	I	I	I	I	I	I
<i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184	I	I	I	I	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	I	I	I	I	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	P	I	I	P	I	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	I	I	I	I	I	I

A=Actividad P=Parcialmente Activo I=Inactivo

Los datos expresados en el cuadro N°8. Indica que el extracto etanólico inicial de *Coursetia dubia* tiene actividad inhibitoria parcial para *Candida albicans*.

No existe ningún otro rasgo de actividad para otro microorganismo por lo tanto no es suficiente la concentración de 10000 µg/ml.

CUADRO No. 9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EL EXTRACTO ETANÓLICO FINAL Y LOS SUBEXTRACTOS ETÉREO Y CLOROFÓRMICO DE *Coursetia dubia*

MICROORGANISMOS	24 HORAS			48 HORAS		
	E.ETANÓLI CO FINAL	S. ETÉRE O	S. CLOROFÓR MICO	E.ETANÓLI CO FINAL	S. ETÉREO	S. CLOROFÓR MICO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	I	I	I	I	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	I	I	I	I	I	I
<i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184	I	I	I	I	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	I	I	I	I	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	P	P	I	P	P	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	I	I	I	I	I	I

A=Actividad P=Parcialmente Activo I=Inactivo

El cuadro No. 9 muestra actividad parcial para *Candida albicans* del extracto etanólico final y el mismo comportamiento presenta el subextracto etéreo, dicha actividad inhibitoria se mantiene hasta las 48 horas.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. Los extractos etanólicos y subextractos etéreo y clorofórmico de *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirencis*, *Coursetia dubia*, si presentan capacidad inhibitoria para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en forma parcial o total, por lo tanto la hipótesis planteada es positiva. Cuadro N° 4-9.
2. Los extractos etanólicos se obtuvieron por maceración del vegetal fresco y se tuvo las siguientes características; Martin Galvis 34.82% de rendimiento, siruposo, color pardo oscuro, aroma a madera, pH 5,42, densidad 0,9629 g/mL, índice de refracción 1,368, con presencia de antraquinonas, triterpenos, esteroides, esteroides, monoterpénos, flavonoides, flavonas, y alcaloides. En el caso del Zorrillo su rendimiento fue 17.42% con aspecto líquido-fluido, color amarillo rojizo, olor aromático picante fuerte, pH 4,32, densidad 1,0531 g/mL, índice de refracción 1,362, con presencia de flavonas, flavonoides, monoterpénos, sesquiterpenolactonas taninos catéticos. La Alverjilla con 18.07% de rendimiento, líquido, color amarillo claro, olor a madera, pH 5,14, densidad 1,0355 g/mL, índice de refracción 1,359, con presencia de flavonas, flavonoides, benzoquinonas, monoterpénos y alcaloides. Cuadro N° 1.
3. Los subextractos se obtuvieron con solventes inmiscibles (éter y cloroformo), con rendimiento de 26% de subextracto etéreo y 1% de subextracto clorofórmico para *Senna multijuga*, para *Tagetes zipaquirensis* 9% y 4%, y para *Coursetia dubia* 3% y 0.8%. Cuadro N°2.

4. Los resultados obtenidos realizados mediante el Método del Test de Mitscher demuestran que de la *Senna multijuga*; el subextracto etéreo de dicho vegetal presenta actividad inhibitoria total para *Staphylococcus aureus*; el subextracto clorofórmico presenta actividad parcial frente a *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*. En lo que se refiere a *Tagetes zipaquirensis* el extracto etanólico inicial (10000, 1000 µg/mL) tiene actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, de igual manera el subextracto etéreo presentó actividad inhibitoria frente a 5 cepas de microorganismos estudiados, siendo este únicamente inactivo para *E. coli*. El extracto etanólico inicial (10000, 1000 µg/mL), extracto etanólico final y etéreo de *Coursetia dubia* presentó actividad parcial frente a *Candida albicans*. Cuadro N° 4-9.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Continuar el estudio de actividad antimicrobiana por el método de Mitscher a diferentes concentraciones de los subextractos etéreos y clorofórmicos de *Senna multijuga* y *Tagetes zipaquirencis* para determinar CMI.
2. Conociendo la actividad antimicrobiana de estas plantas y luego de un estudio mas detallado es necesario la elaboración de un fitofármaco con propiedades antisépticas y contra enfermedades infecciosas.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo determinar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos preparados por maceración y subextractos etéreo y clorofórmico por extracción liquido-liquido de *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella Gallinarum* ATCC 9184 y *Candida albicans* ATCC 10231; a 10000, 1000 y 10 µg/mL, este estudio se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se aplicó el test de Mistcher. El tamizaje indicó que Martin Galvis contiene antraquinonas, triterpenos, esteroides, esteroides, monoterpénos, flavonoides, flavonas, y alcaloides. Para Zorrillo la presencia de flavonas, flavonoides, monoterpénos, sesquiterpenolactonas, taninos catéticos. La Alverjilla flavonas, flavonoides, benzoquinonas, monoterpénos y alcaloides.

Los subextractos se obtuvieron con solventes inmiscibles (éter y cloroformo). La actividad microbiológica de *Senna multijuga*, indica que el subextracto etéreo presenta actividad inhibitoria para *Staphylococcus aureus*; el subextracto clorofórmico actividad parcial para *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto etanólico inicial (10000, 1000 µg/mL) de *Tagetes zipaquirensis* tiene actividad para *Candida albicans*, el subextracto etéreo actividad inhibitoria frente a 5 cepas de microorganismos estudiados, siendo únicamente inactivo para *E.coli*. El extracto etanólico inicial (10000, 1000 µg/mL), extracto etanólico final y etéreo de *Coursetia dubia* presentó actividad parcial para *Candida albicans*.

Se concluye que los extractos etanólicos y subextractos etéreo y clorofórmico de *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*, si presentan capacidad inhibitoria para las 6 cepas. Se recomienda continuar el estudio de actividad antimicrobiana por el método de Mitscher a diferentes concentraciones de los subextractos etéreos y clorofórmicos de *Senna multijuga* y *Tagetes zipaquirensis* para determinar CMI.

ABSTRACT

The present investigation deals with determining the antimicrobial activity of the ethanol extracts prepared through maceration aethereal and chloroformic subextracts through liquid-liquid extraction of *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis* and *Coursetia dubia*, against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella Gallinarum* ATCC 9184 and *Candida albicans* ATCC 10231; to 10000, 1000 and 10 µg/mL. This study was carried out in the laboratories of the Science Faculty of the ESPOCH.

For the determination of the antimicrobial activity the Mistcher test was applied. The sierving indicated that Martin Galvis contains anthraquinones, triterpenes, esterols, esteroids, monoterpenes, flavonoids, flavones, y alkaloids. For Zorrillo the presence of flavones, flavonoids, monoterpenes, sesquiterpenolactones and catetic tannins; for the Alverjilla, flavones, flavonoids, benzoquinones, monoterpenes and alkaloids.

The subextracts were obtained with inmiscible solvents (ether and cloroform). The microbiological activity of the *Senna multijuga*, indicates that the ethereal subextract presents inhibitory activity for the *Staphylococcus aureus*; the chloroformic subextract, partial activity for the *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. The initial ethanolic extract (10000, 1000 µg/mL) of *Tagetes zipaquirensis* has activity for the *Candida albicans*; the ethereal subextract, inhibitory activity agains 5 strains of the studied microorganisms being only active for the *E.coli*. The initial ethanolic extract (10000, 1000 µg/mL) final and ethereal ethanolic extract of *Coursetia dubia* presented partial activity for *Candida albicans*.

It is concluded that the ethanolic extracts and the ethereal and chloroformic subextracts of the *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, and *Coursetia dubia* do present the inhibitory capacity for the 6 strains. It is recommended to continue the antibacterial activity study by the Mitscher method at different concentrations of the ethereal and chloroformic subextracts of the *Senna multijuga* and *Tagetes zipaquirensis* to determine CMI.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1. AGÁPITO., T., SUNG., I.,** Fitomedicina: 1100 Plantas Medicinales., s.ed., Lima-Perú., Editorial Isabel., 2005., Pp. 22-35
- 2. ÁLVARES., V., y otros.,** Manual de Técnicas en Microbiología Clínica., s.ed., Madrid-España., s.edt., 1995., Pp. 28, 70-78, 111
- 3. AUSTIN., S.,** Sociedad indígena y Enfermedad en el Ecuador Colonial., s.ed., Quito-Ecuador., Ediciones Abya-Yala., 1996., Pp 55
- 4. BIAZZI., E.,** El Maravilloso poder de las Plantas., 1era. ed., Buenos Aires-Argentina., Casa Editora Sudamérica., 2008. Pp. 23-44
- 5. BLANCA E., Y BRAVO R.,** Texto de Microbiología. Universidad Central del Ecuador, s.ed., Quito-Ecuador., Facultad de ciencias químicas., 1988., Pp. 193, 222, 224, 245, 347.
- 6. BRUNETON., J.,** Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales., 2da.ed., Editorial Acribia S.A., Zaragoza-España., 2001., Pp. 180-200
- 7. CAMPBELL., P., y otros.,** Bioquímica Ilustrada., 5ta.ed., Madrid-España., Elsevier Masson., Pp. 199
- 8. CASTILLO, E., MARTINEZ, I.,** Manual de Fitoterapia., s.ed., Madrid-España.,Elsevier Masson., 2007., Pp. 214-217

9. **CUEVA., A.**, Plantas silvestres., 1ra.ed., Lima-Perú., Editorial AFA., 2003 Pp. 128-130
10. **EISENBERJ.**, y otros., Trends in alternative medicine use in the United States., s.ed., New York-USA., s.edt., 1997., Pp. 280
11. **ELMER W.**, y otros., Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color., 5ta.ed. Panamericana-Argentina., 2001., Pp. 171, 190, 198, 202, 209, 528-535, 818-825, 955, 1015-1017.
12. **ERNEST., J.**, y otros., Microbiología Médica Manual Moderna., s.ed., México D.F-Mexico., s.edt., 1998., Pp. 312-317
13. **ESTRELLA ., E.**, Medicina Aborigen., s.ed., Quito-Ecuador., Editorial Época, 1977., Pp. 28
14. **FASSIN., D.**, Antropología y Salud en Comunidades Indignas., s.ed., Quito Ecuador., Editorial Abya-Yala., 1992., Pp. 64
15. **FREEMAN., B.**, Microbiología de Burrows., 22a.ed. México DF-México., Mac Graw Hill. 1989., Pp. 580
16. **GARCIA., P.**, Microbiología Clínica Aplicada., 3ra. Ed., Madrid-España., Editorial Díaz de Santos S.A., 1996., Pp. 1-6
17. **GIAMARELLOU., H.**, Anaerobic infection therapy., s.ed., New York-USA., s.edt., 2000., Pp. 341-346
18. **GRANADOS., R.**, Microbiología: Bacteriología. Características y clasificación Bacteriana, Virología. Características y Técnica Bioquímicas., Tomo I., Madrid- España., Editorial Paraninfo S.A., 2003., Pp. 1-10

19. **GUTKIND., G.,** y otros., Fitoterapia., s.ed., Buenos Aires Argentina., s.edt., 1981., Pp 52.
20. **IGLESIA., G.,** Sacha Jambí El uso de las plantas en la medicina tradicional de los Quichuas del Napo., s.ed., Quito-Ecuador., s.edt., 2010., Pp. 19-22
21. **JAWETZ, E.,** y otros., Microbiología Médica Manual Moderno., s.ed., Mexico D.F-Mexico., s.edt., 1983., Pp. 213
22. **KOHLER., P.,** El Poder Curativo del Ginkgo., s.ed., Málaga-España., Editorial Sirio., 1999., Pp. 60-61
23. **KONEMAN., E.,** y otros., Diagnóstico Microbiológico., 5ta.ed., Buenos Aires-Argentina., Editorial Médica Panamericana., 2004 Pp. 238,239, 245-256.
24. **LLOP., A.,** y otros., Microbiología y Parasitología Médicas., s.ed., La Habana-Cuba., s.edt., 2001. Pp. 9, 37, 38, 45-50
25. **MENSA., J.,**y otros., Guía terapéutica antimicrobiana., 14ava. ed., Barcelona-España., Editorial Masson S.A., 20004., Pp 35-39
26. **MIRANDA., G.,** Farmacognosia y productos naturales., s.ed., La Habana-Cuba., Universidad de la Habana. 2006., Pp. 32-44, 56-62
27. **MORALES., M.,** Plantas Medicinales y Medicina Natural., 2da.ed., Santiago de Chile., s.edt., 2009., Pp. 1-7
28. **MUÑOZ, J.** Guía para el Análisis de Vegetales. 2da ed., Quito-Ecuador., s.edt., 1982. Pp. 55-60
29. **NARANJO., P.,** Etnomedicina y mitología., s.ed., Quito-Ecuador., Editorial Libri Mundi., 1983., Pp. 44

- 30. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) (2002).** Document M31-A2. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard, Second Edition. NCCLS document M31-A2. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania.,USA., 1987., Pp. 80
- 31. PAHISSA., A.,** Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* ., 1ra. ed., Valencia-España., Editorial Soto., 2009., Pp. 21-30
- 32. PAMPLONA., R.,** Enciclopedia de las Plantas Medicinales., 2da.ed., Madrid-España., Casa Editora Sudamérica., 2007. Pp. 37-100
- 33. RODRIGUEZ., M.,** Introducción a la Fitoterapia y la Medicina Tradicional., s.ed., México D.F-México., Editorial Herbal., 1998., Pp. 48-66
- 34. AMARILYS., G., y otros.,** Susceptibilidad antimicrobiana de la *Escherichia coli* aislada en pacientes con sepsis urinaria alta., No. 5., Quito-Ecuador., s.edt., 2006., Pp. 5-11
- 35. COWAN., M.,** Plant Products as antimicrobial agents., No. 4.Vol. 12., Madrid-España., 1999 Pp. 564-582.
- 36. DE PAULA., J., Y MARTÍNEZ., A.,** Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*., No. 5., La Habana-Cuba., 2000., Pp. 9-26
- 37. HARVEY., A.,** Strategies for Discovering Drugs from Previously Unexplored Natural Products., No.5., 2000., Pp. 7

- 38. KATSURA., H.**, y otros., In Vitro Antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms., Antimicrobial agents and chemotherapy., No. 11.Vol. 45., 2000., Pp. 3009-3013
- 39. MANTILLA., J.**,Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Salmonella* grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia., No. 1.Vol. 1., Bogotá-Colombia., 2010., Pp. 22-24
- 40. ZURITA., J.**, Resistencia a los antimicrobianos en el Ecuador., No.6.Vol. 5368., Quito-Ecuador., 1999., Pp. 13-16
- 41. ZURITA., J.**, Un problema que crece: las bacterias resisten cada vez más a los antibióticos., No.1., Quito-Ecuador., 1994., Pp.16-18
- 42. ZURITA., J.**, Registro sanitario y antibióticos., No. 5.Vol. 1081., Quito-Ecuador., 2012 Pp. 18-20
- 43. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN (INEN).**,Fitoterápico Droga De Calidad Cruda Especificaciones Generales. Quito-Ecuador. NT. No. 1602., 1999. Pp. 6-12
- 44. BONILLA., C.**, Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de carrasquilla (*Berberis hallii*) sobre *Escherichia coli* ATCC N° 9637, *Candida albicans* ATCC N°10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC N° 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC N°6538.,Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2011., Pp. 83-94
- 45. CAMACHO., D.**,Determinación de la actividad insecticida del Shampoo con extracto de *Sambucus nigra l. franseria artemisioides w*, y *Tagetes zipaquirensis Hen Ctenocephalides cani.*, Escuela Superior Politécnica de

Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia.
Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2011., Pp. 12-14

- 46. ESTRADA., P.**, Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los Extractos de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*)., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia., Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2010., Pp. 60-70
- 47. GÓMEZ., A.**, Caracterización De Extractos y Aceites Esenciales Y Evaluación De La Actividad Biológica De Hoja De Tres Especies De *Piperaceas* (*P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum*)., Universidad de San Carlos de Guatemala., Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Escuela de Química Farmacéutica., Guatemala-Guatemala., **TESIS.**, 2008., Pp. 32-37
- 48. HERING., C.**, Análise estrutural de folha de *Senna multijuga subsp. lindleyana* (gardner) h.s. irwin & barneby (leguminosae, caesalpinoideae) e localização in situ de compostos com ação biológica de interesse farmacológico., Instituto de Botânica de la Consejería de Medio Ambiente, São Paulo-Brasil., **TESIS.**, 2010., Pp. 37.
- 49. GUALAVISÍ., L.**, Creación e introducción del manejo de la historia clínica, el parte diario y el concentrado mensual de Medicina Tradicional Andina, en un servicio de salud del Ministerio de Salud Pública., Universidad San Francisco de Quito., Facultad de Salud Pública., Escuela de Salud Pública., Quito-Ecuador., **TESIS.**, 2008 P.p. 6-120
- 50. ORTUÑO., M.**, Determinación de la actividad biológica del extracto acuoso de Sauco *Sambucus nigral.* como repelente y/o insecticida en *Lasius niger.*, Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2011., P.p. 30-40

51. SANTANA., L., Perfil de resistencia bacteriana de infecciones urinarias en pacientes embarazadas atendidas en el servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Provincial General Docente Riobamba durante el periodo Enero-Diciembre 2008., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Salud Pública., Escuela de Medicina., Riobamba-Ecuador., **TESIS.**, 2009., P.p 50-55

52. AAN UNUSUAL STRUCTURAL MOTIF OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES CONTAINING END-TO-END MACROCYCLE AND CYSTINE-KNOT DISULFIDES.

<http://www.apicoladelalba.cl/actividad-antimicrobiana-de-plantas-sci/>
2012/09/08

53. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

http://es.wikipedia.org/wiki/Actividad_biol%C3%B3gica
2012/09/05

54. ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF SOME PLANT EXTRACTS

http://cdn.intechopen.com/pdfs/32894/InTechAntimicrobial_and_antioxidant_activities_of_some_plant_extracts.pdf
2012/09/08

55. ANTIMICROBIANOS NATURALES

dialnet.unirioja.es/servlet/fichero_articulo?codigo=20244320
12/09/03

56. ARBOLES TROPICALES COMUNES DEL AREA MAYA

http://ucr.ucr.edu/arboles_nombres-especie.php?numero=220
2012/09/05

57. BACTERIA STAPHYLOCOCCUS AUREUS: SÍNTOMAS, CONTAGIO Y TRATAMIENTO

<http://suite101.net/article/bacteria-taphylococcus-aureus-sintomas-contagio-y-tratamiento-a43652>
2012/09/07

58. BACTERIAS

<http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/Bacteria.htm>
2012/09/06

59. BREVE HISTORIA DE LA MEDICINA NATURAL

<http://www.bonesherbes.com/ingles/historiaesp.htm>
2012/09/02

60. CATEGORIASHERBOLARIAS

http://www.deturno.com/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=58:ique-son-los-fitofarmacos&catid=42:on-articulo&Itemid=75
2012/09/06

61. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO TAGETES

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S036503752008000100008&lng=es&nrm=iso
2012/09/05

62. COSAS QUE NO SABÍAS SOBRE COLI

<http://higieneialiments.blogspot.com/2011/06/cosas-que-no-sabias-sobre-e-coli.html>
2012/09/07

63. CURACIÓN CON PLANTAS, DON DE LOS INDIGENAS

<http://www.milenio.com/cdb/doc/impreso/8652900>
2012/09/02

64. DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO

<http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2009/CU/CU0901.xml;CU2009100257>

65. DETECCIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae*

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000200004&lng=pt&nrm=iso
2012/09/07

66. ESTUDIO IN VITRO DE ANTIMICÓTICOS CONTRA CEPAS DE CANDIDA AISLADAS DE PACIENTES DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

<http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2012/rmd122b.pdf>
2012/09/08

67. EXTRACCIONES

http://musguito.net.ve/salud/preparaciones_fitoterapeuticas.htm
2012/09/04

68. EXTRACTOS VEGETALES

<http://www.sanopordentro.com/extractos-vegetales.html>
2012/09/4

69. FARMACIAS VIVAS Y VERDES

<http://www.saludancestralcruzroja.org.ec/web/index.php/farmacia-verde/plantas-medicinales/106-plantas-medicinales.html>
2012/09/02

70. FITOTERAPIA

<http://herbielatino.wordpress.com/fitoterapia/varios/pls-amicrob/>
20/09/05

71. GENOMALAB FITOMEDICAMENTOS

http://www.genommalab.com/es/investigacion_cientifica/fitomedicamentos.aspx

2012/09/04

**72. GUÍA DE TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN PRODUCIDA POR
*Staphylococcus aureus***

<http://seq.es/seq/0214-3429/21/4/mensa.pdf>

2012/09/07

73. HERBARIUM NETWORK

<http://intermountainbiota.org/portal/taxa/index.php?taxon=152975>

2012/09/05

74. INTOXICACIONES POR PLANTAS Y SETAS

http://www.formacionsanitaria.com/cursos/intoxicaciones_plantas/materia_l/intoxicaciones_plantas_completo.pdf

2012/09/02

**75. LA MEDICINA TRADICIONAL A TRAVÉS DE LA PRACTICA
TERAPEUTA**

Scongresos.cio.mx/2_enc_mujer/Extenso/orales/Platica%2013.doc

2012/09/02

76. LAS PLANTAS MEDICINALES

<http://www.cfnavarra.es/BIF/boletines/14/1401.htm>

2012/09/.

77. MEDICINA NATURAL Y NUTRICIÓN

<http://blogdefarmacia.com/3-antibioticos-naturales/>

2012/09/05

78. MEDICINA NATURAL-EXTRACCIÓN

http://plantasmedicinales-jey.blogspot.com/2010_04_11_archive.html
2012/09/05

79. MEDICINA TRADICIONAL

<http://portal.madrededios.com.pe/index.php/datos-generales/medicina-tradicional>
2012/09/02

80. MEDICINA CHINA

http://www.femalt.com/medtradchina_fitoterapia_riesgos.shtml
2012/09/04

81. MEDICINAL PLANT SEEDS

<http://www.henrietteesherbal.com>
2012/09/05

82. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE UNA PLANTA

<http://perso.wanadoo.es/getn/terapias/plantas.htm>
2012/09/03

83. MÉTODOS DE LABORATORIO PARA LOS ENSAYOS DE SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.06.%20M%E9todos%20de%20laboratorio.pdf
2012/09/08

84. NUESTRA CIENCIA

http://www.biologia.puce.edu.ec/imagesFTP/11333.Revista_Nuestra_Ciencia_No.13op.pdf

2012/09/22

85. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

<http://www.who.int/es/>

2012/09/02

86. PLANTAS CON ACCION ANTIMICROBIANA

<http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>

2012/09/08

87. PREPARACIONES MAGISTRALES

<http://www.buenastareas.com/ensayos/Laboratorio-De-Farmacia-Magistral-Extractos-Y/616351.html>

2012/09/05

88. PROCEDIMIENTOS EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

http://www.educa.madrid.org/cms_tools/files/8fe96293-faab-4630-b14b-89ee5825509a/Microbiologia/M%C3%A9todos_b%C3%A1sicos_antimicrobianos.pdf

2012/09/08

89. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS

<http://minnie.uab.es/~veteri/21273/Practica%202.2009-10.pdf>

2012/09/08

90. RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN AISLADOS CLÍNICOS DE PSEUDOMONSAERUGINOSA EN UN HOSPITAL UNIVERSITARIO EN LIMA, PERÚ

<http://es.scribd.com/doc/14229371/Resistencia-a-los-antibioticos-en-aislados-clinicos-de-Pseudomonas-aeruginosa-en-un-hospital-universitario-en-Lima-Peru-Rev-Biomed>

2012/09/08

91. SALMONELLA AVIAR

<http://www.slideshare.net/ALEJANDRAJAIME/salmonella-en-aves>
2012/09/06

92. SALMONELOSIS AVIAR (*Salmonella gallinarum*)

<http://www.cuencarural.com/granja/avicultura/78667-salmonelosis-aviar-salmonella-gallinarum/>
2012/09/08

93. *Staphylococcus aureus*

<http://staphylococcus-aureus.blogspot.com/>
2012/09/07

94. TENDENCIAS ACTUALES EN EL CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS NATURALES

<http://www.bioquimifarma.org/Conferencias/ControlProductosNaturales.pdf>
2012/09/08

CAPÍTULO VIII

8. ANEXOS

ANEXO Nº1. TRATAMIENTO DE LAVADO DE *Senna multijuga*



FOTOGRAFÍA Nº6. TRATAMIENTO DE LAVADO DE *Senna multijuga*, LABORATORIO DE FITOQUIMICA. FACULTAD DE CIENCIAS, ESPOCH

**ANEXO N°2. EVAPORACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCOHOL DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS
DE *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, *Coursetia dubia***



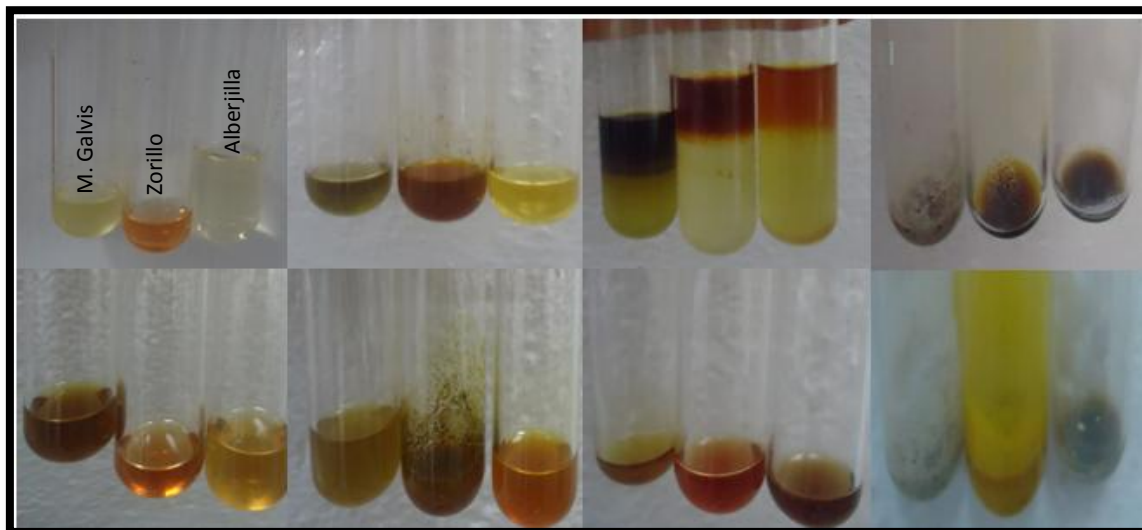
**FOTOGRAFÍA N°7. EVAPORACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCOHOL DE LOS EXTRACTOS
MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DEL ROTAVAPOR. LABORATORIO DE
FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO 2012**

**ANEXO No. 3. EVAPORACIÓN DEL CONTENIDO DE ÉTER Y CLOROFORMO DE LOS
SUBEXTRACTOS DE *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, *Coursetia dubia***



**FOTOGRAFÍA N°8. EVAPORACIÓN DEL CONTENIDO DE ÉTER Y CLOROFORMO
MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DEL ROTAVAPOR. LABORATORIO DE
FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012**

ANEXO No 4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis* y *Coursetia dubia*.



FOTOGRAFÍA No. 9. ENSAYOS DE TAMIZAJE FITOQUÍMICO REALIZADO A LOS EXTRACTOS DE *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JUNIO 2012.

ANEXO No. 5. SUBEXTRACTOS ETÉREOS Y CLOROFORMICOS DE *Senna multijuga*, *Coursetia dubia* y *Tagetes zipaquirensis*,



FOTOGRAFÍA No. 10. SUBEXTRACTOS ETÉREOS Y CLOROFORMICOS DE *Senna multijuga*, *Tagetes zipaquirensis*, y *Coursetia dubia*. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.

ANEXO No. 6. REACTIVACIÓN DE *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



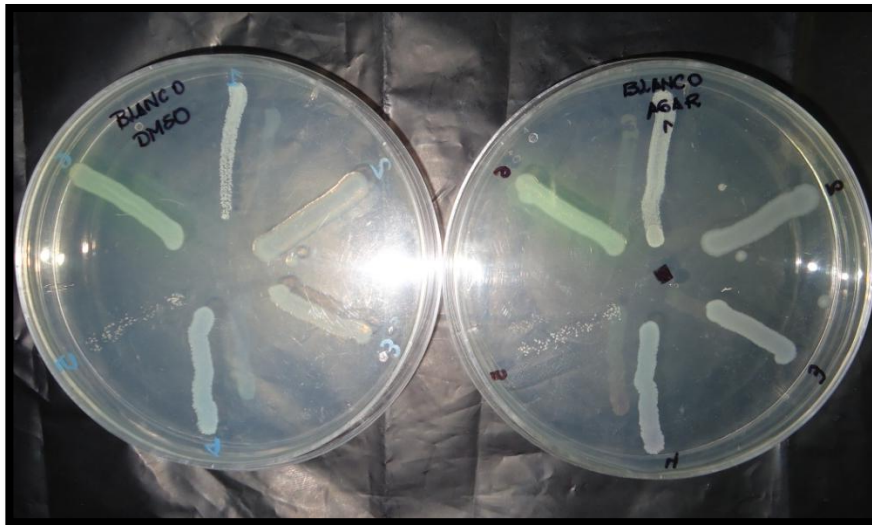
FOTOGRAFÍA N°11. REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS CONSERVADAS EN EL AREA DE INVESTIGACION Y DESARROLLO EN EL LABOROTARIO DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA, FACULTAD DE CIENCIAS ESPOCH, JULIO 2012

ANEXO No 7. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS Y SUBEXTRACTOS MEDIANTE TEST DE MISTCHER. .



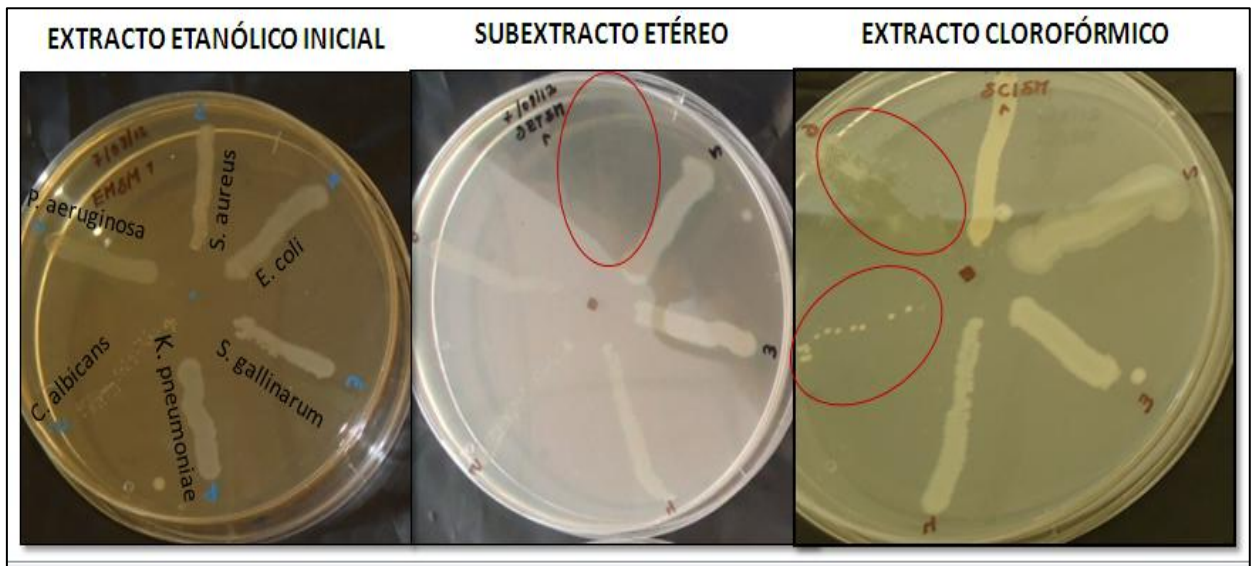
FOTOGRAFÍA N°12. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.

ANEXO No 8. CRECIMIENTO MICROBIANO SOBRE BLANCO DE AGAR Y DMSO.



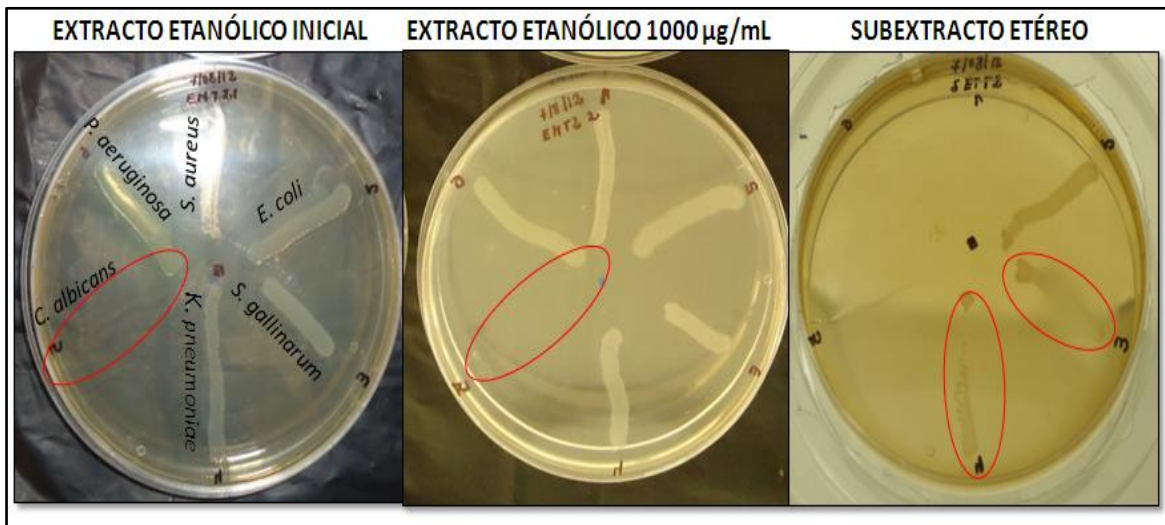
FOTOGRAFÍA No. 13. CRECIMIENTO MICROBIANO SOBRE BLANCO DE AGAR Y DMSO. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.

ANEXO No 9. RESULTADOS DEL TEST DE MITSCHER PARA EL EXTRACTO ETANÓLICO INICIAL Y SUBEXTRACTOS DE *Senna multijuga* EN 24 HORAS DE INCUBACIÓN.



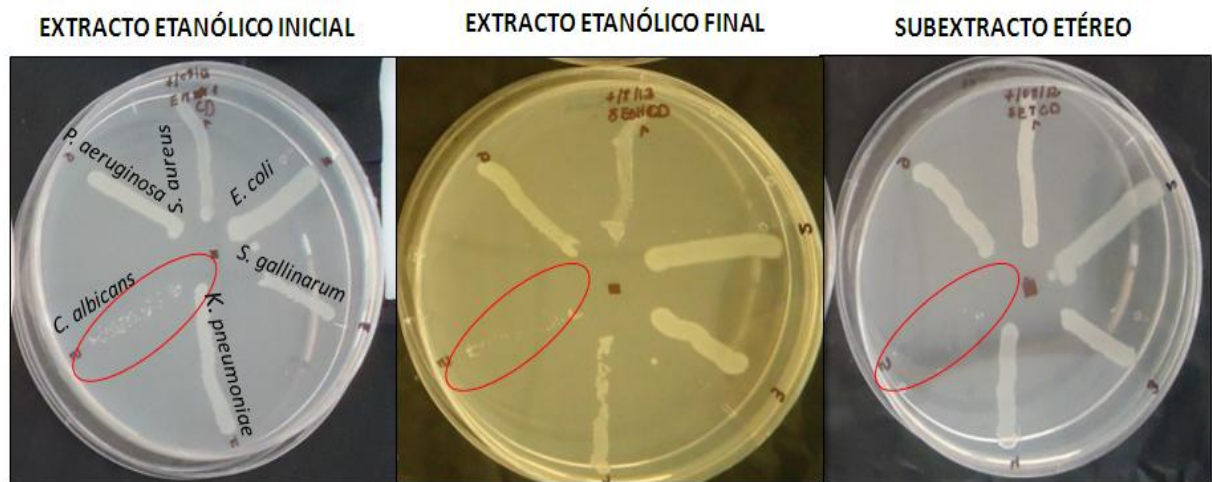
FOTOGRAFÍA No. 14. RESULTADOS DEL TEST DE MITSCHER PARA EL EXTRACTO ETANÓLICO INICIAL Y SUBEXTRACTOS DE *Senna multijuga*. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.

ANEXO No 10. RESULTADOS DEL TEST DE MITSCHER PARA LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y SUBEXTRACTO ETÉREO DE *Tagetes zipaquirensis* EN 24 HORAS DE INCUBACIÓN.



FOTOGRAFÍA No. 15. RESULTADOS DEL TEST DE MITSCHER PARA LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y SUBEXTRACTO ETÉREO DE *Tagetes zipaquirensis*. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.

ANEXO No 11. RESULTADOS DEL TEST DE MITSCHER PARA LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y SUBEXTRACTO ETÉREO DE *Coursetia dubia* EN 24 HORAS DE INCUBACIÓN.



FOTOGRAFÍA No. 16. RESULTADOS DEL TEST DE MITSCHER PARA LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y SUBEXTRACTO ETÉREO DE *Coursetia dubia* EN 24 HORAS DE INCUBACIÓN. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO 2012.